



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut
Grup de Recerca en Nutrició Comunitària i Estrès Oxidatiu
Laboratori de Ciències de l'Activitat Física

ciberobn
Centro de Investigación Biomédica en Red
Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición
Grupo CB12/03/30038

**EFFECTOS DEL OXÍGENO HIPERBÁRICO SOBRE EL DAÑO
OXIDATIVO Y LOS MECANISMOS ANTIOXIDANTES EN
DEPORTISTAS Y SU EFECTO REGENERADOR EN LAS
LESIONES DE DIFÍCIL CURACIÓN**

Memoria para optar al Grado de

Doctor por la *Universitat de les Illes Balears*

Programa Doctorado Ciencias Médicas Básicas del
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

Presentada por

JUAN MIGUEL BATLE VIDAL

Palma de Mallorca, Noviembre de 2013

Con el beneplácito de los Directores

Dr. Antoni Pos Biescas
Catedrático de Universidad

*Àrea de Bioquímica y Biología
Molecular
Dept. Biologia Fonamental i
Ciències de la Salut*

Dr. Antoni Sureda Gomila
*Profesor Contratado Doctor de
Universidad*

*Àrea de Bioquímica y Biología
Molecular
Dept. Biologia Fonamental i
Ciències de la Salut*

El interesado

Juan Miguel Batle Vidal

*A la Oxigenoterapia Hiperbárica
Ciencia, no milagro.*

AGRADECIMIENTOS

El mundo tiene más de tres cuartas partes que todavía están sin explorar, en el momento que nos interesamos por lo que no se ve, es cuando entramos en el apasionado mundo submarino, un mundo azul que a todo el que lo visita crea adicción, que por mucho tiempo que permanezcas en él, siempre te sabe a poco, eso sí un poco salado y con ansias de volver a sumergirte. Exactamente lo mismo ocurre en el mundo de la Medicina Hiperbárica, una ciencia que está todavía casi inexplorada, que cuanto más la estudias, más te apasiona.

Esta tesis se inicio en 1995 y han sido muchos lo que me han impulsado a realizar este trabajo y muchos a los que agradecer su ayuda.

A Jacques-Yves Cousteau (1910-1997), al que tuve el honor de conocer en 1991, inventor del artilugio que me ha permitido explorar cómodamente el apasionado mundo de las profundidades y que con sus filmaciones despertaron mi inquietud por el mundo hiperbárico.

Al Dr. Francisco Campos Pascual, que fue el que me dio el empujón y su colaboración para fundar MEDISUB Institut de Recerca Hiperbàrica y con el que llevamos a cabo los primeros tratamientos de buceadores accidentados. Al Dr. Joan Alguersuari Bés, presidente de Juaneda por su amistad y apoyo, y por creer en mis sueños. A Tofol, sin su ayuda no existiría MEDISUB. A Antonio Silvero, Miguel Tugores, Aníbal Alonso, Aina, Pepe Conesa, Juan Trigoso, Manuel Navío, Jaime Ferriol, entre otros, buceadores y amigos que me han ayudado durante más de 15 años.

A los miembros de la Federació Balear de Activitats Subacuàtiques, que me ha ayudado en los trabajos de investigación en relación a los estudios de buceadores de Apnea. A la Escuela Náutica Pesquera de Palma de Mallorca, a los profesores que me han

permitido estudiar a los alumnos, y a los alumnos que me han permitido que estudie su fisiología en el entorno del buceo con escafandra.

A todos los médicos compañeros y amigos que han creído en la Oxigenoterapia Hiperbárica en el proyecto de MEDISUB.

A todos los pacientes incrédulos de la efectividad de la oxigenoterapia Hiperbárica, que después de muchos años sufriendo alguna patología y tras pocos días de tratamiento ver que evolucionan favorablemente, y nos dicen “això és un miracle” y a lo que yo les respondo “Sí, en el ranking de milagros, después de Fátima y Lourdes, está MEDISUB”; y a sus médicos, que también incrédulos, han retado mi capacidad científica para demostrar la efectividad de la Oxigenoterapia Hiperbárica.

A los compañeros del Laboratorio de Nutrición Comunitaria y Estrés Oxidativo por todo su esfuerzo y dedicación en encontrar datos en la oscuridad del mundo submarino.

Al Dr. Josep Antoni Tur Marí, con el que desde la infancia hemos compartido nuestras vidas y amistad, siempre me ha ofrecido su ayuda incondicional, que con su ojo clínico y visión de futuro me ha asesorado en todo momento en todos mis proyectos científicos y docentes.

Al Dr. Antoni Pons, que desde que hablamos por primera vez en 1998 ha sido un gran amigo, me ha asesorado, me ha apoyado, me ha dirigido en todo momento en todos mis proyectos científicos y en especial en la realización de esta tesis doctoral.

Al Dr. Antoni Sureda, amigo, compañero de fatigas, seguro que sin él esta tesis no existiría, que además de saber dirigirme me ha dado su gran apoyo y ayuda en todos los aspectos. A su Silvia, que tanto nos ha ayudado en su crítica constructiva y asesoramiento científico-gramatical.

A mi madre y mi padre, que tantas preocupaciones les he causado y siempre me han sabido comprender ofreciendo su apoyo.

A mis hermanos que han compartido mis momentos álgidos y otros no tan álgidos, que espero logren comprenderme.

A mis hijas Rosina y Laia, que con mi dedicación a la Medicina Hiperbárica, es posible que en algunos momentos hayan estado faltas del calor paterno, con la convicción de que mis actuaciones les sirvan de ayuda y ejemplo.

A Luisa, mi esposa, persona a la que más quiero del mundo, hemos compartido nuestras vidas en lo bueno y en lo malo, ya que siempre ha estado acompañada de una gran soledad debido a mis excesivas exigencias científico-laborales. *Moltes gràcies, Lluïsa!!!*

ÍNDICE

Abreviaturas	3
Resumen	5
Agradecimientos a la financiación recibida	9
Lista de artículos y manuscritos	11
1. Introducción	13
1.1 Especies reactivas	15
1.2. Efectos de las especies reactivas	17
1.3. Especies reactivas como mensajeros celulares	19
1.4. Mecanismos de defensa antioxidante	20
1.5. Sistema inmunitario: respuesta inmune de fase aguda	23
1.6. Actividad física y estrés oxidativo	24
1.7. Hipoxia-reoxigenación	26
1.8. Hiperbaria e hiperoxia	27
1.8.1. Aplicaciones de la oxigenoterapia hiperbárica	30
1.9. Buceo con escafandra autónoma	32
2. Objetivos	35
3. Planteamiento experimental	39
4. Resultados	47
Manuscrito I. Neutrophil tolerance to oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation	49
Manuscrito II. Repetitive apnea diving sessions induces an adaptative antioxidant response in mononucleated blood cells	51
Manuscrito III. Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils	69
Manuscrito IV. Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares no without oxidative damage	71

Manuscrito V. Scuba diving activates vascular antioxidant system	73
Manuscrito VI. Scuba diving induces nitric oxide synthesis and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response in neutrophils	75
Manuscrito VII. Hyperbaric oxygen therapy in the management of chronic wound induces an antioxidant response and modulates plasma VEGF and endothelin-1	97
Manuscrito VIII. Prevención de embolismo arterial gaseoso en buceadores en apnea. Estudio de 50 casos de accidentes descompresivos en apnea	117
5. Recapitulación	141
5.1. Adaptaciones antioxidantes al oxígeno hiperbárico y al ejercicio físico	143
5.2. Adaptaciones antioxidantes a la hipoxia y al ejercicio físico	147
5.3. Mecanismos moleculares de acción de la oxigenoterapia hiperbárica	148
5.4. Protocolo de actuación para evitar accidentes disbáricos en la práctica de deportes en apnea	149
6. Conclusiones	151
7. Bibliografía	157

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AST	Aspartato aminotransferasa
ATA	Atmósfera absoluta
BATLE	Breath-hold Apnea Tables for Lower Embolism
CAIB	Comunidad Autónoma de las Illes Balears
CAT	Catalasa
CK	Creatina quinasa
COX	Ciclooxigenasa
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
ET-1	Endotelina 1
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HOCl	Hipoclorito
HSF	Factor de shock térmico
HO-1	Hemooxigenasa-1
HO₂•	Radical hidroxiperoxilo
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRP1	Factor de respuesta al hierro-1
LDH	Lactato deshidrogenasa
LOX	Lipoxigenasa
MDA	Malondialdehído
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosforilado reducido
NFκβ	Factor Nuclear kappa beta
NK	Natural Killer
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO• / NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa

OHB	Oxigenoterapia hiperbárica
OH[•]	Radical hidroxilo
O₂^{•-}	Anión superóxido
ONOO-	Peroxinitrito
PaO₂	Presión parcial de oxígeno
PMA	Forbol-1,2-miristato-1,3-acetato
PMN	Células polimorfonucleadas
RFA	Respuesta inmune de fase aguda
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
RO[•]	Radical alcoxilo
ROO[•]	Radical peroxilo
ROS	Especies reactivas del oxígeno
-SH	Grupo tiol
SOD	Superóxido dismutasa (CuZnSOD, MnSOD, EC SOD)
TLR	Receptor Toll-like
TR	Tioredoxina reductasa
TNF	Factor de necrosis tumoral
VEGF	Factor de crecimiento vascular
¹O₂	Oxígeno singlete
8oxoHG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina



EFFECTOS DEL OXÍGENO HIPERBÁRICO SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO Y LOS MECANISMOS ANTIOXIDANTES EN DEPORTISTAS Y SU EFECTO REGENERADOR EN LAS LESIONES DE DIFÍCIL CURACIÓN

Tesis doctoral, Joan Miquel Batle Vidal, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Grup de Recerca en Nutrició Comunitària i Estrès Oxidatiu, Laboratori de Ciències de l'Activitat Física, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, España. CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERobn CB12/03/30038), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), España.

RESUMEN

El oxígeno atmosférico, aunque esencial para la vida, puede dar lugar a moléculas altamente reactivas denominadas especies reactivas de oxígeno que pueden reaccionar con facilidad con los diferentes componentes celulares pudiendo generar estrés oxidativo y daño celular. Estas mismas especies reactivas pueden actuar como mensajeros celulares induciendo, entre otras respuestas, la inducción de una respuesta antioxidante para evitar daños oxidativos potencialmente perjudiciales para las células. Así, el objetivo central de la presente tesis doctoral ha sido evaluar los efectos de diferentes condiciones ambientales: la hipoxia, la hiperbaria y la hiperoxia junto con la práctica de actividad física sobre los mecanismos de defensa antioxidante y el posible daño oxidativo en células sanguíneas y plasma. Adicionalmente, se ha estudiado la eficacia de la oxigenoterapia hiperbárica en pacientes con heridas crónicas de larga duración.

El buceo en apnea se ha utilizado como modelo de estudio para evaluar la respuesta adaptativa antioxidante del sistema inmunitario al estrés oxidativo inducido por episodios repetitivos de hipoxia-reoxigenación en deportistas sanos. La práctica repetitiva de buceo en apnea durante cinco días consecutivos induce adaptaciones en la maquinaria antioxidante de neutrófilos y células mononucleares de sangre periférica y retrasa el tiempo de respuesta oxidativa de los neutrófilos. Esta mejora de la capacidad antioxidante evita la aparición de daño oxidativo en estas células, sin embargo, no lo impide en plasma donde puede venir mediado por una mayor actividad de la xantina oxidasa.

La oxigenoterapia hiperbárica consiste en administrar oxígeno al 100% a una presión superior a la ambiental. Una sesión de oxigenoterapia hiperbárica en individuos sanos induce un aumento en la producción linfocitaria de H₂O₂ con un incremento de los enzimas antioxidantes y de la hemoxigenasa-1, pero sin evidencia de daño oxidativo.

La práctica de buceo con escafandra a gran profundidad supone someter al organismo a situaciones de hiperoxia e hiperbaria que sumado a la práctica de actividad física puede instaurar una situación de estrés oxidativo. Una sesión de buceo con escafandra a profundidades de 40 a 50 metros genera una situación de estrés oxidativo con un aumento en marcadores de daño muscular, de los niveles de malondialdehído y 8oxoHG plasmáticos y de la producción linfocitaria de H₂O₂. Se induce la síntesis de óxido nítrico y una adaptación de las defensas antioxidantes en los diferentes compartimentos celulares sanguíneos y plasma para evitar el daño oxidativo asociado al buceo. Además, se produce una disminución en la respuesta oxidativa de los neutrófilos reduciendo la sensibilidad frente a estímulos. A nivel de neutrófilos, el buceo induce la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y genes relacionados con la regulación de la respuesta inmune. Los niveles plasmáticos de endotelina-1 decrecen tras el buceo mientras que se incrementa la producción de óxido nítrico lo que puede contribuir a regular el grado de vasodilatación. El aumento en los niveles plasmáticos del factor de crecimiento vascular endotelial puede contribuir a estimular la resistencia tisular al daño oxidativo asociado al buceo con escafandra.

La exposición intermitente al oxígeno hiperbárico, estimula diversos procesos biológicos que favorecen la curación en numerosos cuadros clínicos en los que la hipoxia es el elemento dominante. La terapia con oxigenoterapia hiperbárica en pacientes con heridas de difícil curación estimula las defensas antioxidantes en plasma y regula los procesos de angiogénesis y tono vascular al incrementar los niveles del factor de crecimiento vascular endotelial y disminuir los de endotelina-1, que pueden ser importantes factores en el proceso de curativo.

Los accidentes descompresivos son un fenómeno que se producen no solo durante la práctica de deportes subacuáticos con escafandra, sino también a causa de la práctica deportiva en apnea. Desde el año 1995 se ha procedido a realizar el seguimiento y análisis de los accidentes disbáricos con especial atención a los tiempos de inmersión, la profundidad alcanzada y los tiempos en superficie. Con los datos obtenidos se han elaborado unas tablas en las que se recogen los tiempos mínimos que

deben permanecer los deportistas en superficie entre inmersiones para evitar los accidentes disbáricos. Desde su aplicación, el número de accidentes asociados a la apnea se han reducido de forma significativa.

AGRADECIMIENTOS A LA FINANCIACIÓN RECIBIDA

Esta Tesis Doctoral ha podido ser desarrollada gracias a:

- Ministerio Español de Sanidad y Consumo (Instituto de Salud Carlos III, Programa de Promoción de la Investigación Biomédica y Ciencias de la Salud, Proyectos 05/1276, 08/1259, 11/01791 y PI021593, Red Predimed (RETIC RD06/0045/1004), Acción Estratégica en Salud del Ministerio de Ciencia e Innovación DPS2008-07033-C03-03 y CIBERobn, ref. núm. CB12/03/30038).
- Ministerio Español de Ciencia y Educación, Proyecto DEP2005-00238-C04-02/EOU.
- Concesión de ayudas a grupos de investigación competitivos en el sistema de innovación de las Illes Balears, financiado por la Comunitat Autònoma de les Illes Balears (Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats, Direcció General d'Universitats, Recerca i Transferència del Coneixement) y cofinanciado con fondos FEDER de la Unión Europea (referencia no. 35/2011 y 23/2012).
- Grup de Recerca en Nutrició Comunitària i Estrès Oxidatiu de la Universidad de las Islas Baleares que forma parte de:
 - Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERobn), CB12/03/30038.
 - Red EXERNET.
 - Centre Català de la Nutrició (Institut d'Estudis Catalans).

LISTA DE ARTÍCULOS

1. Antoni Sureda, Joan Miquel Batle, Pere Tauler, Nuria Cases, Antoni Aguiló, Josep A. Tur & Antoni Pons (2004) Neutrophil tolerance to oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation. *Free Radic Res.* 38(9):1003-9.
2. Juan M Batle, Antoni Sureda, Josep A Tur & Antoni Pons. Repetitive apnea diving sessions induces an adaptative antioxidant response in mononucleated blood cells. *Manuscrito.*
3. Miguel D. Ferrer, Antoni Sureda, Juan M. Batle, Josep A. Tur & Antoni Pons (2007) Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. *Free Radic Res.* 41(3):274-81.
4. Antoni Sureda, Miguel D Ferrer, Joan M Batle, Pedro Tauler, Josep A Tur & Antoni Pons (2009) Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Med Sci Sports Exerc.* 41(6):1271-6.
5. Antoni Sureda, Joan M. Batle, Miguel D. Ferrer, Antònia Mestre-Alfaro, Josep A. Tur & Antoni Pons (2012) Scuba diving activates vascular antioxidant system. *Int J Sports Med.* 33(7):531-6.
6. Antoni Sureda, Joan Miquel Batle, Xavier Capó, Miquel Martorell, Josep A. Tur & Antoni Pons. Scuba diving induces nitric oxide synthesis and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response in neutrophils. *Manuscrito.*
7. Joan Miquel Batle, Antoni Sureda, Miquel Martorell, Xavier Capó, Josep A. Tur & Antoni Pons. Hyperbaric oxygen therapy in the management of chronic wound induces an antioxidant response and modulates plasma VEGF and endothelin-1. *Manuscrito.*
8. Joan Miquel Batle. Prevención de embolismo arterial gaseoso en buceadores en apnea. Estudio de 50 casos de accidentes descompresivos en apnea. *Manuscrito.*

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Especies reactivas

La mayoría de los organismos vivos, entre ellos el ser humano, utilizan el oxígeno molecular (O_2) para respirar y muchos no pueden vivir sin él. El éxito de los organismos aeróbicos reside en el hecho de que gracias al oxígeno se puede extraer más energía de los alimentos que aquella que pueden obtener los organismos anaeróbicos. Sin embargo, en muchos procesos inflamatorios e isquémicos, un metabolismo anormal del oxígeno puede tener un protagonismo importante en los mecanismos de lesión celular. Esta toxicidad del oxígeno se explica por la producción de los denominados radicales libres del oxígeno, altamente reactivos y que son factores responsables de la lesión e incluso de la muerte celular en circunstancias patológicas. Los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, capaces de existir en forma independiente, que se producen en todas las células. La mayoría de los radicales que se producen *in vivo* son originados tanto a partir de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como de nitrógeno (RNS).

Las células, en condiciones normales, generan continuamente radicales libres como parte fundamental de sus procesos metabólicos. Las ROS se generan como resultado de procesos bioquímicos básicos para el mantenimiento del estado vital como son la fosforilación oxidativa y el transporte de oxígeno en sangre, o la acción de enzimas como la NADPH oxidasa, xantina oxidasa y la glucosa oxidasa, entre otros (Jackson 2000). Estas ROS son altamente reactivas y tienen el potencial de reaccionar con una gran variedad de especies químicas pudiendo afectar a las propias estructuras celulares alterando su función (Halliwell 1994).

Los organismos dependientes del O_2 se han ido adaptando progresivamente a su presencia durante siglos, produciendo mecanismos enzimáticos de defensa encargados de destruir algunas formas tóxicas, como son los radicales libres. Por ello, el valor de la presión parcial de oxígeno (PaO_2) se ha estabilizado en un valor equivalente al del 21% de O_2 dentro del aire a 1 ATA. Para contrarrestar estos radicales libres las células disponen de un elaborado sistema antioxidante que les permite mantener un balance equilibrado. La situación de estrés oxidativo aparece como consecuencia de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes del organismo.

En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno hasta agua sin formación de intermediarios tóxicos. Sin embargo, un pequeño porcentaje (alrededor de un 5% del oxígeno) genera especies reactivas en condiciones normales, mediante la adición sucesiva de electrones al oxígeno molecular (Jenkins 1988). Cuando el oxígeno molecular acepta un electrón proveniente de un agente reductor, el producto primario generado es el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), un radical libre con carga eléctrica negativa capaz de oxidar moléculas orgánicas y de dismutarse reduciéndose a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En el proceso de la fosforilación oxidativo entre el 2-5% del oxígeno reducido es transformado en $O_2^{\bullet-}$ (Davies et al. 1982; Jenkins 1988). Al tratarse de una molécula con carga neta tiene dificultad para atravesar las membranas al pH fisiológico.

La adición de otro electrón conduce a la formación del H_2O_2 . La dismutación del $O_2^{\bullet-}$, de forma espontánea o catalizada por el enzima superóxido dismutasa conllevan la aparición de H_2O_2 (Fridovich 1986). En esta molécula, que no es un radical libre, la unión entre ambos oxígenos es muy débil, lo que le confiere alta reactividad. Su estructura parecida a la del agua le permite difundir fácilmente por las membranas celulares pudiendo iniciar procesos de oxidación en lugares alejados de su punto de origen. En presencia de metales de transición o el grupo hemo la reactividad del H_2O_2 aumenta generándose el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), altamente reactivo. La elevada reactividad de este radical le confiere una vida media muy corta, de manera que su acción se limita a las proximidades donde se ha generado. A partir del H_2O_2 y por la acción del enzima mieloperoxidasa se puede originar hipoclorito (HOCl) (Hampton et al. 1998). Esta reacción es cuantitativamente importante cuando se produce la explosión respiratoria de las células inmunitarias fagocíticas.

El óxido nítrico (NO^{\bullet}) ha cobrado gran relevancia en los últimos años por la importante función fisiológica que desempeña en el mantenimiento de la homeostasia vascular, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre. Es un gas lipofílico e hidrosoluble, con una vida media relativamente larga de varios segundos. Su formación tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina dando como producto el NO^{\bullet} en numerosos tipos celulares (Moncada et al. 1991). Las NOS fueron clasificadas en un principio de acuerdo a su localización en: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e inducible (iNOS). La nNOS es

una variedad constitutiva de la NOS, y su actividad se regula por activación calcio-calmodulina dependiente. En cambio, la iNOS que se encuentra entre otras células en macrófagos y neutrófilos es inducible por determinados compuestos tales como citoquinas y endotoxina pudiendo generar un aumento importante a nivel vascular. A pesar de poseer un electrón desapareado el NO^\bullet no reacciona fácilmente con la mayor parte de biomoléculas, aunque reacciona rápidamente con otros radicales libres (peroxilo, alcoxilo) generando moléculas menos reactivas, y así actuando como antioxidante (Rubbo et al. 2000). Sin embargo, el NO^\bullet en situaciones donde se generan elevadas cantidades de $\text{O}_2^{\bullet-}$ genera peroxinitrito (ONOO^-) que es altamente citotóxico capaz de reaccionar con sulfhidrilos, metaloproteínas, lípidos, azúcares y ADN (Pryor and Squadrito 1995).

Tabla 1. Principales especies activas del oxígeno y del nitrógeno relacionadas con el estrés oxidativo

Radicales		No radicales	
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Anión superóxido	H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
OH^\bullet	Radical hidroxilo	$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
HO_2^\bullet	Radical hidroxiperoxilo	HOCl	Hipoclorito
ROO^\bullet	Radical peroxilo	ONOO^-	Peroxinitrito
RO^\bullet	Radical alcoxilo		
NO^\bullet	Óxido nítrico		

1.2. Efectos de las especies reactivas

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden iniciar procesos de peroxidación lipídica dañando tanto la estructura como la función de las membranas, pueden ser responsables de la oxidación de proteínas clave para el metabolismo y funcionamiento celular, y pueden causar la oxidación de ácidos nucleicos. Todas estas acciones pueden provocar disfunciones celulares, afectar a la integridad de las células e incluso pueden iniciar procesos apoptóticos participando en la regulación del ciclo vital celular.

Peroxidación lipídica. El proceso de peroxidación lipídica se inicia con el ataque por parte de un radical a un ácido graso poliinsaturado. Los ácidos grasos poliinsaturados presentan dobles enlaces que son muy susceptibles de reaccionar con ROS para generar radicales peroxilo y posteriormente peróxidos lipídicos. Los radicales

peroxilo pueden sustraer un átomo de hidrógeno de cadenas de ácidos grasos próximos generando nuevos radicales y propagando el proceso de peroxidación lipídica en forma de reacción en cadena. Los peróxidos lipídicos generalmente se descomponen para formar aldehídos que pueden interaccionar con proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN alterando su estructura (Alessio 2000). El proceso de peroxidación lipídica afecta a la integridad de las membranas y puede dañar a proteínas de la propia membrana.

Oxidación de proteínas. La compleja estructura de las proteínas así como el elevado número de grupos funcionales oxidables las hacen una importante diana para los radicales libres (Tirosh and Reznick 2000). Las proteínas pueden ser atacadas por las ROS generadas en membranas y también por las originadas en las fases acuosas. Las ROS pueden afectar a las cadenas laterales de los aminoácidos provocando la aparición de grupos carbonilo o la formación de enlaces cruzados dentro de la misma proteína, entre diferentes proteínas o entre proteínas y grupos amino de lípidos (Esterbauer et al. 1991; Halliwell and Gutridge 1989). El efecto de las ROS sobre las proteínas produce la alteración de la configuración espacial de las proteínas con la consiguiente alteración de la funcionalidad, además de inducir una mayor susceptibilidad a sufrir proteólisis.

Oxidación de ADN. Los radicales y especialmente el radical hidroxilo son capaces de fijarse con gran avidez a la purina, pirimidina y azúcares constitutivos de las bases del ADN, alterando su estructura pudiendo provocar la rotura de las bases por hidroxilación o la producción de entrecruzamientos entre bandas de ADN (Hartmann and Niess 2000). La producción de ROS en las mitocondrias, con la consiguiente lesión del ADN mitocondrial y la pérdida de capacidad de regeneración, se apunta como una de las causas más importantes del envejecimiento (Lee and Wei 1997).

El daño tisular causado por diversas enfermedades, trauma, toxinas u otras causas, conduce usualmente a un aumento en la formación de mediadores de inflamación como son las prostaglandinas, leucotrienos, interleuquinas, interferones y factores de necrosis tumoral. Dentro de este listado de mediadores podríamos incluir a las ROS. En la mayoría de las patologías el estrés oxidativo es un efecto secundario que puede conducir al daño tisular. Por ejemplo, los neutrófilos activados producen anión superóxido, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso para destruir a los agentes patógenos. Sin embargo, si comienzan a activarse un gran número de fagocitos en un área localizada, puede llegar a producirse daño tisular.

1.3. Especies reactivas como mensajeros celulares

Las ROS se han considerado durante mucho tiempo únicamente como moléculas nocivas capaces de dañar células y tejidos, pero actualmente son apreciadas por su capacidad de controlar cascadas de señalización celular importantes en el crecimiento y muerte celular, en procesos inflamatorios, o en los mecanismos de adaptación al estrés oxidativo muscular (Pattwell and Jackson 2004). Altas concentraciones de los radicales libres son perjudiciales al producir alteraciones dañinas en las biomoléculas del organismo. Sin embargo, a concentraciones moderadas juegan un importante papel como mensajeros celulares reguladores en los procesos de comunicación y señalización intra e intercelular. Se ha evidenciado que las ROS junto con los antioxidantes influyen la expresión de un gran número de genes, y de vías de transducción de señales y se ha sugerido su acción como mensajeros subcelulares para ciertos factores de crecimiento (Burdon 1996). Además, perturbaciones experimentales en el estado redox celular han demostrado ejercer un gran impacto en los procesos de diferenciación, proliferación celular y apoptosis (Finkel and Holbrook 2000).

Se han descrito un elevado número de vías de transducción de señales y factores de transcripción sensibles a las ROS y a las especies reactivas del nitrógeno (RNS) entre las que destacan las vías de las MAP quinasas, del factor NF κ B, del factor de shock térmico (HSF) y el factor de respuesta al hierro-1 (IRP1) (Allen and Tresini 2000; Pantopoulos et al. 1997; Pattwell and Jackson 2004). A nivel molecular, los mecanismos de regulación de factores de transcripción y de transducción de señales por las ROS no están totalmente esclarecidas; sin embargo, en muchos casos los cambios parecen estar mediados por la oxidación o reducción de grupos sulfhidrilos, o por la nitración de tirosinas (Forman and Torres 2002; Mikkelsen and Wardman 2003). Cambios en el estado redox de las proteínas conllevan cambios conformacionales que, dependiendo de la proteína, pueden aumentar o disminuir su capacidad de unión al ADN, liberar subunidades inhibitorias o promover la formación de complejos necesarios para su activación.

Una sobreproducción de especies activadas podría inducir la activación de mecanismos de defensa para paliar el daño oxidativo que lleva asociado. Es preciso conocer si proteínas con función antioxidante se ven inducidas por situaciones que supongan el aumento de ROS como pueden ser la práctica de un ejercicio físico o procesos que sometan al organismo a hiperoxia como la oxigenoterapia hiperbárica o el buceo con escafandra.

1.4. Mecanismos de defensa antioxidante

Como es imposible prevenir la producción *in vivo* de todos los radicales libres, no es sorprendente que se hayan desarrollado en el cuerpo una cantidad de defensas antioxidantes, de hecho están presentes antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. De hecho, el organismo dispone de un complejo sistema de defensa antioxidante que incluye compuestos y enzimas antioxidantes que son de vital importancia para eliminar las ROS y limitar el daño celular (Clarkson and Thompson 2000).

Antioxidantes enzimáticos. Los enzimas antioxidantes son responsables de la transformación de las ROS en especies no reactivas y de la reparación de los posibles daños producidos por la oxidación. Los enzimas antioxidantes primarios, que se encargan de eliminar un tipo particular de ROS, incluyen la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa. Dentro de los enzimas antioxidantes también se incluyen otros enzimas como la glutatión reductasa necesaria para la regeneración del glutatión (Powers and Sen 2000).

La superóxido dismutasa (SOD) es la enzima responsable de la detoxificación del anión superóxido. Esta enzima dismuta los radicales superóxido para generar peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Se conocen tres clases distintas de enzimas SOD, dos de ellas intracelulares: la Cu/Zn SOD de localización citoplasmática y la Mn SOD de localización mitocondrial, y la tercera es extracelular (EC-SOD).

La glutatión peroxidasa (GPX) cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a agua y de hidroperóxidos orgánicos al alcohol correspondiente, usando glutatión reducido (GSH) como dador de electrones (Halliwell and Gutridge 1989). La necesidad de GSH para que la glutatión peroxidasa pueda funcionar hace necesaria la existencia de un mecanismo para la regeneración del GSH. El reciclaje del GSH se consigue mediante la acción de la glutatión reductasa (GR) que, utilizando el NADPH como cofactor, reduce el GSSG. El NADPH necesario para la reacción se produce de forma mayoritaria en la vía de las pentosas a partir de glucosa (Powers and Sen 2000).

La catalasa (CAT) cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno para dar lugar a agua y oxígeno molecular de forma independiente del glutatión. La catalasa se encuentra ampliamente distribuida en la célula, aunque las mayores concentraciones se encuentran en las mitocondrias y en los peroxisomas (Halliwell and Gutridge 1989).

La tioredoxina es una proteína altamente conservada con dos residuos de cisteína que pueden ser oxidados de forma reversible para formar un puente disulfuro. Este puente disulfuro puede ser reducido por la acción del enzima tioredoxina reductasa (Elias et al. 1999).

Antioxidantes no enzimáticos. Los antioxidantes no enzimáticos representan un grupo muy diverso de compuestos. Los nutrientes antioxidantes constituyen un conjunto de nutrientes esenciales para el organismo, que actúan a diferentes niveles de la cadena de reacciones oxidativas que inician las ROS. Destacan las vitaminas C y E, los carotenos, los compuestos fenólicos, etc. Algunos productos finales del metabolismo como el ácido úrico y la bilirrubina también se consideran como antioxidantes, así como otros compuestos sintetizados por las células como el glutatión o la tioredoxina. El reciclaje de proteínas, la degradación de proteínas modificadas y la síntesis de nuevas proteínas funcionales, además de los procesos de reparación del ADN también pueden considerarse como parte del sistema de defensa antioxidante (Powers and Sen 2000).

La vitamina E es el antioxidante mayoritario en medios lipídicos por su naturaleza liposoluble. El término genérico vitamina E se refiere al menos a 8 isómeros estructurales del tocoferol. Entre éstos, el alfa-tocoferol es el más conocido dado que presenta la más potente actividad antioxidante. La vitamina E, como antioxidante, es capaz de reaccionar con radicales libres como el anión superóxido, el radical hidroxilo y peróxidos lipídicos para transformarlos en formas menos reactivas. Además, es el antioxidante más importante a la hora de detener el proceso de reacción en cadena de la peroxidación lipídica de membranas (Burton and Traber 1990).

La vitamina C o ácido ascórbico se encuentra ampliamente distribuida por los tejidos del organismo en los ambientes acuosos debido a su naturaleza hidrosoluble. Su concentración es elevada en la glándula adrenal (Yu 1994). La vitamina C puede actuar directamente sobre radicales libres como el radical hidroxilo, el anión superóxido, especies reactivas del nitrógeno o sobre hidroperóxidos lipídicos. Además, la vitamina C juega un papel importante en el reciclaje de la vitamina E (Packer et al. 1979).

El tripéptido glutatión (GSH) (gamma glutamil-cisteinil-glicina) es el tiol de bajo peso molecular más abundante en casi todas las células de mamíferos. El glutatión reducido se caracteriza por su grupo tiol (-SH) muy reactivo pudiendo actuar de

reductor interactuando numerosos oxidantes y contribuyendo a mantener reducido los grupos sulfhidrilos de las proteínas.

Tabla 2. Principales antioxidantes celulares

Enzimas Antioxidantes	Propiedades
Superóxido dismutasa	<ul style="list-style-type: none"> • Localizada en la mitocondria y el citoplasma • Dismuta radicales superóxido
Glutación peroxidasa	<ul style="list-style-type: none"> • Localizada en la mitocondria, el citoplasma y la membrana celular • Detoxifica peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos
Catalasa	<ul style="list-style-type: none"> • Localizada principalmente en peroxisomas • Detoxifica peróxido de hidrógeno
Glutación reductasa	<ul style="list-style-type: none"> • Localizada en la mitocondria, el citoplasma y la membrana celular • Reducción del glutatión oxidado y del ascorbato
Tioredoxina reductasa	<ul style="list-style-type: none"> • Repara grupos sulfhidrilo oxidados • Recicla la tioredoxina
Antioxidantes no-enzimáticos	Propiedades
Vitamina E	<ul style="list-style-type: none"> • Principal antioxidante liposoluble localizado en membranas celulares y lipoproteínas • Evita la peroxidación lipídica
Vitamina C	<ul style="list-style-type: none"> • Principal antioxidante hidrosoluble • Recicla la vitamina E
Carotenoides	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidantes liposolubles • Inhiben la peroxidación lipídica
Glutación	<ul style="list-style-type: none"> • Tiol no proteico, con múltiples funciones antioxidantes • Participa en la reacción catalizada por la glutación peroxidasa
Tioredoxina	<ul style="list-style-type: none"> • Repara grupos sulfhidrilo oxidados • Participa en la reacción catalizada por la tioredoxina reductasa
Compuestos fenólicos	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidantes lipídicos y quelantes de metales

Los carotenoides, como el β -caroteno, son antioxidantes de naturaleza liposoluble actuando principalmente a nivel de las membranas celulares. Su estructura de largas cadenas con dobles enlaces conjugados permite la eliminación de diversas ROS incluyendo los radicales superóxido y peróxido y la desactivación del oxígeno singlete (Young and Lowe 2001; Yu 1994).

El glutatión es un tripéptido (γ -glutamilcisteinglicina) ampliamente distribuido en el organismo y es uno de los antioxidantes mayoritarios con múltiples funciones en

la defensa antioxidante celular (Meister and Anderson 1983). El GSH actúa detoxificando los radicales libres, es sustrato de la enzima glutatión peroxidasa y también es capaz de reducir diversos antioxidantes en la célula regenerando la vitamina C y la vitamina E (Packer 1991; Starke et al. 1997).

La tioredoxina cataliza la reducción de puentes disulfuro de proteínas siendo, por lo tanto, importante en la regulación del estado redox de proteínas con grupos tioles. La tioredoxina puede también actuar directamente detoxificando radicales libres (Starke et al. 1997).

Los compuestos fenólicos son un grupo heterogéneo desde el punto de vista estructural caracterizado por derivar de la misma vía biosintética que los aminoácidos aromáticos. Entre sus mecanismos de acción destacan la captura y disminución de la producción de radicales libres, la eliminación de precursores de los radicales y además, son quelantes de metales (Rice-Evans and Miller 1996).

1.5. Sistema inmunitario: respuesta inmune de fase aguda

La respuesta inmune de fase aguda (RFA) es parte de la respuesta inmunitaria inespecífica, es decir, que no depende del reconocimiento de antígenos concretos. En esta respuesta están implicadas básicamente las células del sistema inmunitario pero también células del sistema nervioso central, músculo esquelético, hígado, páncreas o riñón. Esta respuesta incluye fiebre, leucocitosis, redistribución de hierro (del compartimento extracelular al intracelular) y producción hepática de determinadas proteínas plasmáticas, todo ello destinado a detener o dificultar el crecimiento y la supervivencia de los patógenos en el organismo huésped (Kluger and Rothenburg 1979). Los leucocitos activados fagocitan los microorganismos infecciosos y las proteínas plasmáticas de fase aguda, como la proteína C reactiva, opsonizan las bacterias y los restos celulares potenciando el proceso fagocítico (Rees, Gewurz et al. 1988). A todo ello se une la producción de elevadas cantidades de ROS por parte de los neutrófilos y los monocitos que contribuyen en la destrucción de patógenos invasores (Klebanoff 1992). En la modulación de la RFA intervienen una serie de citoquinas, entre las que destacan la interleuquina (IL)-1, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Dinarello, Cannon et al., 1988). Los microorganismos patógenos y fragmentos celulares que derivan de tejidos dañados, así como el sistema del complemento y las especies reactivas producidas por el organismo afectado, estimulan la producción de

estas citoquinas por parte de los propios tejidos dañados, los monocitos y los macrófagos.

Tras la activación del complemento, el número de neutrófilos circulantes aumenta de forma drástica en pocas horas, y éstos migran rápidamente hacia la zona dañada o de infección, donde fagocitan los microorganismos patógenos y restos celulares (Cannon and Blumberg 2000). De forma más lenta los monocitos también son atraídos al foco de la infección donde contribuyen a la eliminación de los patógenos, pero además liberan factores que promueven la reparación y regeneración del tejido dañado (Maximino, Rapizzi et al., 1997).

Un aspecto importante de la RFA es la inducción de las defensas antioxidantes por parte de las citoquinas y de las propias ROS. Así, los niveles de Mn-SOD, catalasa, ceruloplasmina, óxido nítrico sintasa y metalotioneinas se incrementan en respuesta a las IL-1, IL-6 y el TNF (Karin, Imbra et al. 1985; White, Ghezi et al. 1989; Li 2006). Además, diferentes enzimas proteolíticos son almacenados en forma latente y activados en presencia de ROS (Weiss, Peppin et al. 1985). De la misma forma, las ROS promueven la activación del complemento (Shingu and Nobunaga 1984) y facilitan la translocación vascular de leucocitos a través de la inducción de la expresión de moléculas de adhesión (Patel, Zimmerman et al., 1991).

1.6. Actividad física y estrés oxidativo

Evidencias epidemiológicas demuestran que la práctica de ejercicio físico moderado resulta beneficiosa para la salud. Sin embargo, el ejercicio físico intenso y extenuante incrementa significativamente la producción de ROS propiciando un desequilibrio entre la producción de ROS y el sistema antioxidante, induciendo estrés oxidativo. El daño oxidativo asociado al ejercicio depende de la intensidad y de la duración del ejercicio practicado. Así, tanto el ejercicio de larga duración como un ejercicio más corto pero de gran intensidad son capaces de producir cantidades de ROS suficientes para sobrepasar la capacidad de detoxificación del organismo. Diversas evidencias indican que el entrenamiento regular mejora la resistencia al estrés oxidativo respecto a los sujetos sedentarios (Alessio 1993; Bloomer and Fisher-Wellman 2008). La actividad física incrementa considerablemente la demanda de energía, y para proveer de este oxígeno, el cuerpo podría aumentar su captación tanto como 15 veces, y

el flujo de oxígeno a través de los músculos activos podría incrementarse hasta aproximadamente 100 veces respecto a los valores de reposo.

Las células fagocíticas del sistema inmunitario (neutrófilos, monocitos, eosinófilos y macrófagos) son capaces de generar importantes cantidades de ROS como mecanismo para combatir a los organismos patógenos. Estas células presentan la enzima NADPH oxidasa que cataliza la síntesis de anión superóxido por medio de la reducción univalente del oxígeno molecular por el NADPH (Babior 2000). Los neutrófilos constituyen aproximadamente el 50% de leucocitos circulantes, de manera que pueden ser una fuente muy importante de ROS. El peróxido de hidrógeno derivado del anión superóxido es usado junto con el Cl^- en los neutrófilos por la enzima mieloperoxidasa para generar HOCl con elevado poder oxidante. Entre el 20-70% del H_2O_2 producido por los neutrófilos activados es transformado en HOCl. Aunque el HOCl se genera en el fagosoma, cantidades apreciables de HOCl son liberadas al plasma (O'Brien 2000). El ejercicio físico genera estímulos activadores de estas células fagocíticas lo que conlleva su degranulación y un incremento en la producción de ROS. También se ha descrito que un ejercicio físico extenuante o sesiones prolongadas y repetitivas de ejercicios intensos pueden derivar en una supresión temporal de la capacidad para producir ROS (Suzuki et al. 1996). La degranulación del neutrófilo inducida por el ejercicio intenso se ha sugerido como causa de inhibición de la funcionalidad al disminuir el número de proteínas que participan en el proceso de fagocitosis (Morozov et al. 2003).

Los linfocitos son las células inmunitarias circulantes más abundantes después de los neutrófilos. Normalmente circulan tres tipos de linfocitos: los B, T y unos linfocitos grandes granulares llamados células asesinas naturales (*natural killer*, NK).

Los linfocitos B tienen como función las reacciones inmunológicas humorales o inmediatas. Sintetizan inmunoglobulinas para cada uno de los antígenos presentes en la naturaleza, gracias a la peculiar estructura de genes que las codifican.

Los linfocitos T elaboran linfoquinas (mediadores humorales) y cooperan con los linfocitos B en el reconocimiento del antígeno. Una subpoblación de linfocitos T tiene la característica de interactuar con otras células y destruirlas. A esta capacidad se le denomina capacidad citotóxica.

Las células NK constituyen un 10-20% de los linfocitos de la sangre periférica y son una importante barrera contra las infecciones virales. Las células NK ejercen su

actividad inmunitaria de forma espontánea sin necesidad de una fase de inmunización previa.

Las células, cuando son expuestas a una concentración no letal de radicales libres, responden con la inducción de una gran variedad de genes. Esta respuesta va encaminada a una adaptación celular frente al estrés oxidativo, y también se relaciona con la función de las ROS como mensajeros celulares (Allen and Tresini 2000). De forma genérica, la actividad de los radicales libres viene mediada por la activación de vías de transducción de señales que suponen la activación de factores de transcripción, los cuales se unirán a regiones específicas en la región promotor de sus genes diana. Actualmente, existen pocos estudios que evalúen la expresión de genes inducida por el estrés oxidativo asociado al ejercicio físico (Fehrenbach et al. 2003; Ji et al. 2004; Lauer et al. 2005).

1.7. Hipoxia-reoxigenación

La hipoxia, entendida como la falta relativa de oxígeno para cubrir las demandas metabólicas, y la reoxigenación, entendida como la reintroducción de oxígeno en el tejido hipóxico, son importantes en patofisiología humana ya que aparecen en gran variedad de situaciones patológicas (Li and Jackson 2002; McCord 1985). Entre estas patologías se incluyen las derivadas de la apnea del sueño, el shock circulatorio, el trasplante de órganos o el infarto de miocardio. Una situación de hipoxia no letal, que puede ser temporal y no presentar consecuencias aparentes, puede ser seguida de un aumento de su resistencia frente a futuras situaciones de hipoxia (tolerancia) o producir importantes daños por reoxigenación (Cepinskas et al. 1999; Kitagawa et al. 1991). En respuesta a la hipoxia, las células experimentan cambios específicos en las actividades enzimáticas, en la función mitocondrial, el transporte de membrana y en las defensas antioxidantes; estos cambios en conjunto predisponen al daño por reoxigenación. Los neutrófilos activados pueden contribuir al daño vascular durante la reoxigenación, aunque el daño celular post-hipóxico también puede producirse en ausencia de células inflamatorias por medio de mecanismos que involucran ROS y RNS (Li and Jackson 2002; Umbrello et al. 2013). Existen evidencias que relacionan las ROS con el daño celular inducido por la hipoxia-reoxigenación que incluyen peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas (Li and Jackson 2002; Tan et al. 1999).

Diversos autores han estudiado el estrés oxidativo asociado a la hipoxia-reoxigenación en diferentes tipos celulares (Schinetti et al. 1989; Terada 1996; Yao et

al. 1999). Sin embargo, existen pocos estudios realizados “*in vivo*”. El ejercicio físico en pacientes que presentan obstrucción pulmonar crónica provoca una situación de hipoxia. El ejercicio en estos pacientes induce la oxidación del glutatión, que puede ser atenuado en parte con una terapia con oxígeno (Vina et al. 1996). La situación de hipoxia y reoxigenación en deportistas que practican la pesca submarina en apnea puede ser un buen modelo de estudio “*in vivo*” para establecer las adaptaciones del sistema inmunitario al estrés oxidativo inducido por hipoxia-reoxigenación en humanos sanos (Lemaitre et al. 2010). Algo parecido ocurre en los practicantes de actividades deportivas subacuáticas como la Pesca Submarina o Apnea consiguiendo alcanzar profundidades de hasta 63 metros. El tiempo de estancia subacuática en apnea oscila entre dos y tres minutos a una presión equivalente a 4-5 ATAs. Para recuperarse de dicha apnea están en superficie durante un intervalo de unos dos o tres minutos; consiguiendo unas 15 inmersiones a la hora, repitiendo dicho evento a lo largo de un periodo de entre unas tres horas y hasta ocho horas de entrenamiento (Batle 1999). La sintomatología que aparece en todos los casos es sintomatología neurológica y suele aparecer de forma inmediata a la llegada a la superficie; lo que provoca la finalización del entrenamiento (Batle 1999).

1.8. Hiperbaria e hiperoxia



La hiperoxia es una condición en la cual la concentración de oxígeno se encuentra por encima de los niveles fisiológicos. La oxigenoterapia hiperbárica (OHB) consiste en administrar oxígeno al 100% (por

maskarilla, casco o tubo endotraqueal) a un individuo sometiéndolo a una presión ambiental superior a las 1,3 atmósferas absolutas, lo que se consigue en un recinto cerrado denominado Cámara Hiperbárica.

Por la Ley de Boyle Mariotte se sabe que, a temperatura constante, al aumentar la presión sobre una masa gaseosa, ésta experimenta una reducción proporcional de su volumen. En este efecto se basa el tratamiento de aquellos accidentes en los que se origine un embolismo gaseoso que pueden aparecer con la práctica del buceo

(enfermedad descompresiva, sobrepresión pulmonar) o con el empleo de maniobras diagnósticas y/o terapéuticas (manipulación de vías venosas centrales, laparoscopias diagnósticas o terapéuticas, toracoscopias, incluso artroscopias, etc.) (Feldmeier 2003). En el caso de la enfermedad descompresiva se trataría de burbujas de nitrógeno; en el síndrome de sobrepresión pulmonar y en los embolismos aéreos iatrógenos, la naturaleza del émbolo depende del gas problema. Pero en ambos casos al someter al paciente a un aumento controlado de la presión ambiente se consigue que el volumen del gas se reduzca de una manera inversamente proporcional al incremento de presión. Así, la terapia con OHB provoca una disminución del tamaño de las burbujas de gas en sangre.

Por la Ley de Henry sabemos que, a temperatura constante, cuando un gas entra en contacto con un líquido, el gas tiende a disolverse en el líquido en función de: la constante de disolución del gas en el líquido, la presión a la que se encuentren sometidos el gas y el líquido y el tiempo en que estén en contacto. Cuando se respira oxígeno en un ambiente hiperbárico se incrementa hasta en 23 veces la cantidad de oxígeno disuelto en el plasma, con lo que los tejidos hipóxicos que reciban irrigación sanguínea, aunque ésta sea escasa, pueden beneficiarse de esta fuente de oxígeno necesaria para su metabolismo, restituyéndose los mecanismos de cicatrización, la neocolagenización, la neovascularización, etc.

Si bien la existencia de una hipoxia aguda es el principal factor estimulante del proceso antiinflamatorio, la presencia de una hipoxia generalizada y mantenida paraliza o ralentiza la formación de nuevos capilares y tejidos. El establecimiento de amplios gradientes de presión entre tejido hipóxico y límites sanos mediante la OHB, devuelve la capacidad de re-vascularización (Sheikh et al. 2000; Yogaratnam et al. 2006). De esta forma se obtiene un tejido de granulación exuberante sobre territorios hipóxicos, difícil de observar fuera de la terapia hiperbárica. Así, este efecto es de gran importancia en el tratamiento de infecciones necrotizantes de partes blandas, así como en el de los retardos de cicatrización en territorios isquémicos, como el pie diabético.

El oxígeno administrado en ambiente presurizado es capaz de inhibir la producción de toxinas por anaerobios. La alta mortalidad derivada de la mionecrosis clostridial (gangrena gaseosa), es debida fundamentalmente al shock tóxico hemolítico inducido por las exotoxinas. El único fármaco capaz de inhibir su producción es la

terapia con OHB. Además, este tipo de terapia tiene un efecto bactericida directo sobre los gérmenes anaerobios y antimicrobianos (Mader and Wilson 1981).

Sin embargo, el aumento en los niveles de oxígeno sanguíneos conlleva asociado un aumento significativo en la concentración de ROS (Narkowicz et al. 1993; Thom 2009) y, en consecuencia, en la oxidación de componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Dennog et al. 1996; Gröger et al. 2005; Oter et al. 2005). La respuesta celular a la OHB se ha estudiado principalmente en modelos animales (Etlik et al. 1997; Harabin et al. 1990), y sólo recientemente se ha comenzado a estudiar en humanos (Benedetti et al. 2004; Dennog et al. 1999; Speit et al. 2000). En todo caso, se ha sugerido que una sesión de OHB puede representar un buen modelo para la investigación del estrés oxidativo en humanos sin que exista ningún proceso patológico (Dennog et al. 1996; Rothfuss et al. 1998; Speit et al. 1998) ni tampoco un cansancio o desgaste o proceso inflamatorio debido al ejercicio físico de los deportistas. Así, se ha detectado que una sesión de terapia hiperbárica en individuos sanos induce modificaciones importantes de las funciones de las células polimorfonucleadas (PMN) tales como un descenso de la quimiotaxis y un incremento en la producción de H_2O_2 y en la fagocitosis, así como un ligero incremento en el status antioxidante del plasma (Labrousche et al. 1999). Asimismo, después de una sesión de terapia hiperbárica se detectó la aparición de daño oxidativo en las bases del ADN así como roturas en la cadena de ADN. Este daño a nivel de ADN se detectó sólo tras una primera sesión hiperbárica, pero no tras la aplicación de tratamientos sucesivos, indicando un incremento de las defensas antioxidantes y una respuesta adaptativa (Dennog et al. 1996). Otros estudios han mostrado que células sanguíneas tomadas de individuos expuestos a OHB estaban completamente protegidas frente a la inducción de daño oxidativo en el ADN inducido por la administración de H_2O_2 (Rothfuss et al. 1998). Varios estudios del mismo grupo de investigación pusieron de manifiesto que esta respuesta adaptativa podía ser debida a la inducción del enzima hemoxygenasa-1 (HO-1) (Rothfuss et al. 2001; Speit et al. 2000), responsable de la degradación del grupo hemo, y cuyos productos de reacción son bilirrubina, ión ferroso y monóxido de carbono (CO). La HO-1 es un enzima altamente inducible por agentes que causan estrés oxidativo (Dennery 2000; Elbirt and Bonkovsky 1999), y parece tener un papel importante en el incremento de la resistencia celular contra el estrés y daño oxidativo (Choi and Alam 1996; Vile et al. 1994; Vile and Tyrrell 1993). Esta protección celular suele ser atribuida a la incrementada producción de bilirrubina, un reconocido

antioxidante celular, y al incremento en el secuestro de hierro debido a los niveles aumentados de ferritina (Choi and Alam 1996; Elbirt and Bonkovsky 1999).

1.8.1. Aplicaciones de la oxigenoterapia hiperbárica

La exposición intermitente al oxígeno hiperbárico, sola o más comúnmente asociada con otros procedimientos médicos o quirúrgicos, estimula diversos procesos biológicos que favorecen la curación en numerosos cuadros clínicos en los que la hipoxia es el elemento dominante (Sander et al. 2009; Yogaratnam et al. 2006). La hiperoxigenación tisular se obtiene al aumentar mediante suministro de oxígeno al 100% con una presión ambiental elevada (consiguiendo unos niveles de Presión arterial de Oxígeno de hasta 2.500 mm Hg) a todos los tejidos del organismo (Figura 1).

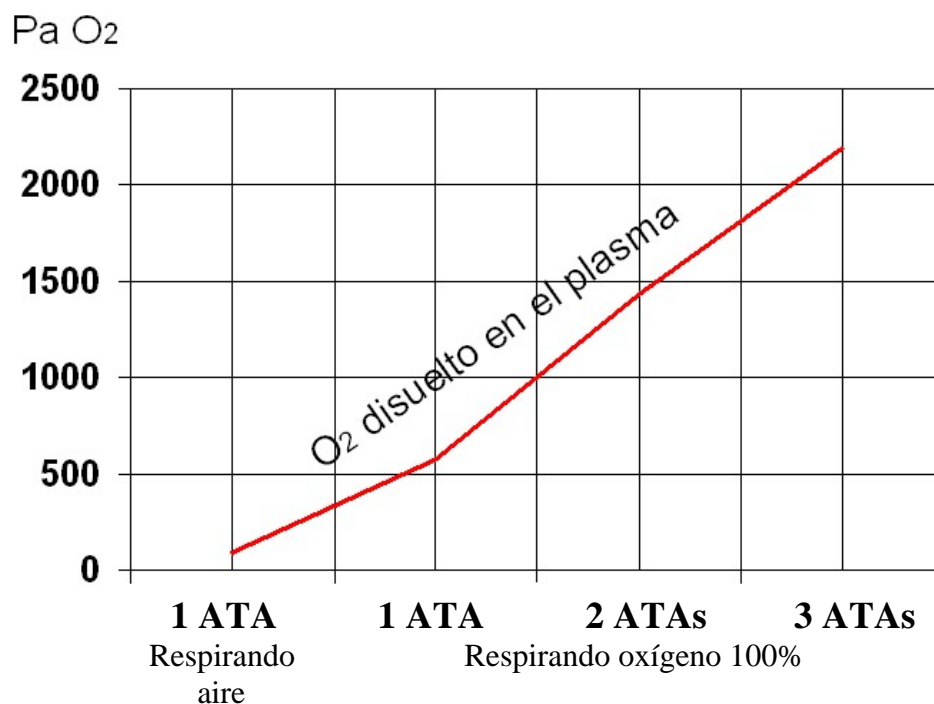


Figura 1. Presión arterial de Oxígeno en relación a la Presión ambiental

La alta concentración de oxígeno respiratorio y a causa de la presión ejercida sobre él y según la Ley de Henry y de Graham, la concentración de oxígeno disuelto en el plasma sanguíneo puede llegar con una cantidad de alrededor de 6,8 ml/100ml.

El efecto vasoconstrictor arteriolar sin hipoxia constituye hoy por hoy el único mecanismo terapéutico, no isquémico, aplicable para el tratamiento del edema en diferentes situaciones: en las quemaduras, en el implante de injertos, en los síndromes compartimentales, en las isquemias traumáticas agudas de los miembros, y en los traumatismos de la médula espinal. El estímulo para la formación de colágeno, lograda a través de una mayor actividad del fibroblasto, y la angiogénesis, mediante la formación de nuevos capilares sanguíneos, constituyen una respuesta del organismo ante la exposición al oxígeno hiperbárico, que tienen gran utilidad terapéutica para facilitar la curación de las heridas crónicas (pie diabético) y mejorar aquellos tejidos dañados por la radiación terapéutica (Hinneburg 2013; Thackham et al. 2008).

La cicatrización es un proceso oxígeno-dependiente, pues con presiones tisulares de oxígeno inferiores a 40 mmHg, la neovascularización, la producción de fibroblastos y la formación de colágeno están disminuidas o prácticamente abolidas (Thackham et al. 2008). Por el mismo mecanismo se inhibe la formación de especies reactivas, resultado de la actividad fagocítica de los neutrófilos, reduciendo su actividad en la reparación tisular y antimicrobiana. Como resultado se mantiene el círculo vicioso hipoxia-infección-retardo de cicatrización-hipoxia. Una situación especial la constituye el llamado pie diabético, en cuyos enfermos coinciden diferentes circunstancias (macroangiopatía, microangiopatía, neuropatía e infección) responsables de frecuentes amputaciones, a pesar de tratamientos combinados medicoquirúrgicos (Hinneburg 2013). La oxigenoterapia aumenta la presión tisular de oxígeno estimulando con ello la neovascularización, la proliferación de fibroblastos y una producción de colágeno más estable al potenciar el paso de prolina a hidroxiprolina y restaurar la función bactericida de los macrófagos. Es decir, la terapia hiperbárica restaura los procesos de angiogénesis, autoreparación y autodefensa abolidos por la hipoxia mantenida, lográndose en muchos casos la cicatrización del proceso (Thackham et al. 2008). La pauta suele consistir en un número variable de sesiones de 60-90 minutos a 2,3-2,5 ATAs hasta que se aprecie un aumento de la granulación, lo que suele ocurrir entre la segunda y la cuarta semana de tratamiento (Thackham et al. 2008).

El tratamiento de las heridas de difícil curación con oxigenoterapia hiperbárica tiene una elevada relación coste-beneficio. El tratamiento acelera la curación de las heridas crónicas, reduce la necesidad de amputaciones, disminuye los días de hospitalización, acelera la resolución de infecciones tórpidas, y mejora la reabsorción

del edema adelantando el alta quirúrgica. Sin embargo, hoy en día, todavía se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares que se activan tras la terapia hiperbárica.

1.9. Buceo con escafandra autónoma

El ser humano ha evolucionado en el medio terrestre sometido a la presión atmosférica. Cualquier inmersión, independientemente de su profundidad y duración, supone un cambio en el medio habitual que provocará una serie de modificaciones y adaptaciones del organismo a la nueva presión. A diferencia de lo que ocurre en el medio aéreo en el que para que la presión disminuya a la mitad hay que ascender hasta los 5.000 metros, al bucear, para que la presión sea el doble que la atmosférica es suficiente con sólo descender 10 metros.

El inicio del buceo moderno data de 1953 con la invención del *aqualung* por Cousteau y Gagnan y que sería la base de lo que hoy se denomina buceo autónomo, mediante el empleo de botellas de aire comprimido. Mediante estos sistemas, las dificultades que plantea el buceo en apnea (limitación de las reservas de oxígeno y el aumento de la presión ambiental) se ven eliminadas o atenuadas en comparación con el buceo con aire comprimido.

El buceo con escafandra autónoma se caracteriza por la exposición a situaciones de hiperoxia resultantes del consumo de oxígeno a elevadas presiones típicas de la profundidad a la que se desciende. Durante la compresión que se produce en el descenso, la presión hidrostática se compensa con el aumento paralelo a la presión de la mezcla respiratoria que conlleva un aumento progresivo de las presiones parciales tanto del oxígeno como del nitrógeno y de los otros gases que forman la composición del aire. Con el aumento de la presión ambiente las microburbujas de nitrógeno se comprimen por la ley de Boyle y aumenta la presión de gas dentro de ellas con disminución de su diámetro. Durante la exposición, los tejidos van acumulando presión de nitrógeno disuelto dependiendo de la profundidad y del tiempo total de inmersión. La interacción entre la tensión de gas disuelto en un tejido y la presión del gas dentro de las microburbujas puede significar el crecimiento de éstas, especialmente durante el ascenso y post buceo, formando pequeñas burbujas, silentes e inocuas, hasta burbujas de mayor tamaño y cantidad que pueden causar un daño que se manifiesta como la enfermedad por descompresión. Una regla básica durante el ascenso es realizarlo de tal

manera que la presión del gas libre dentro de la burbuja sea mayor que la tensión del gas disuelto, de este modo la burbuja disminuye su tamaño. En este sentido es esencial realizar las inmersiones y ascensos siguiendo las tablas de descompresión con las paradas de seguridad adecuadas.

Así, la práctica de este deporte además de ser muy cuidadoso con las normas de seguridad requiere de un buen estado de salud para prevenir daños tisulares y accidentes (Dujic et al. 2008). Los principales efectos de una inmersión vienen provocados por el llamado *diving reflex*, reflejo vagal inducido por el estímulo de los receptores del rostro, motiva la aparición de bradicardia y vasoconstricción periférica. Asimismo, por la diferencia de presión torácica y abdominal se origina un aumento del trabajo cardíaco con las posibles alteraciones hemodinámicas que se puedan derivar. También se produce un moderado incremento de la presión arterial (Boussuges et al. 2006). El buceo con aire comprimido supone un aumento en la densidad del gas respirado lo que provocará un mayor trabajo respiratorio. A la situación de hiperoxia durante la práctica del buceo se añade la realización de actividad física. Así, la respuesta fisiológica y psicológica al ambiente subacuático es diferente a la terrestre, requiriendo un mayor esfuerzo físico así como el estar sometido a un mayor estrés psicológico. Como consecuencia, tanto la hiperoxia como la actividad física pueden conducir a una situación de estrés oxidativo; sin embargo, el posible estrés oxidativo asociado al buceo con escafandra autónoma no ha sido nunca estudiado en profundidad hasta el momento.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Existen numerosas situaciones fisiológicas y patológicas relacionadas con una incrementada producción de especies reactivas. La práctica de una actividad física de alta intensidad induce una respuesta inmunitaria de fase aguda similar a la que produce una infección. Esta respuesta inmunitaria se caracteriza por una neutrofilia, en algunos casos linfopenia, y por la síntesis y liberación de citoquinas y proteínas de fase aguda. En esta situación los neutrófilos se encuentran en una situación de pre-activación presentando una mayor capacidad de generar especies reactivas si son activados. La respuesta inmunitaria contribuye a la instauración de estrés oxidativo asociado a la actividad física. Además, el ejercicio físico supone un aumento considerable del transporte y consumo de oxígeno que se traduce en un aumento en la producción mitocondrial y eritrocitaria de especies activadas de oxígeno. Este proceso, asociado a un incremento de especies reactivas, podría verse incrementado si el ejercicio se desarrolla en un ambiente de hipoxia, como es el caso del buceo en apnea, y de hiperoxia, como es el caso del buceo con escafandra autónoma.

Sin embargo y por otro lado, la oxigenación hiperbárica se utiliza como terapia para una serie de enfermedades que se benefician de los efectos físicos, fisiológicos y bioquímicos obtenidos por la saturación de oxígeno a altas presiones. La hiperoxigenación ayuda a la regeneración de los tejidos dañados por quemaduras, heridas, o por enfermedades que causan compromiso circulatorio (mala circulación), como la diabetes, facilitando el proceso de cicatrización e incrementando el crecimiento y regeneración de vasos capilares y favoreciendo la actividad antimicrobiana.

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es el de evaluar los efectos de condicionantes ambientales como la hipoxia/reoxigenación, la hiperoxia, la hiperbaria y la actividad física sobre el equilibrio oxidativo y las adaptaciones que inducen en los mecanismos antioxidantes y el daño oxidativo y nitrosativo. Este objetivo principal se pretende resolver mediante la consecución de los siguientes objetivos específicos:

- En primer lugar, se pretende evidenciar la existencia de procesos adaptativos en neutrófilos y linfocitos que generen tolerancia frente a episodios repetitivos de

estrés oxidativo utilizando el modelo de hipoxia-reoxigenación asociada a la práctica continuada de pesca submarina en apnea.

- En segundo lugar, se pretende determinar los efectos de una sesión de oxigenoterapia hiperbárica en individuos sanos, en ausencia de actividad física, sobre los mecanismos de defensa antioxidante y daño oxidativo en plasma y linfocitos.
- En tercer lugar, se pretende evaluar la práctica de una actividad física en condiciones de hiperbaria e hiperoxia, como una sesión de buceo con escafandra autónoma, sobre los mecanismos antioxidantes de las células sanguíneas y del plasma, así como la posible inducción de daño oxidativo en los diferentes compartimentos sanguíneos (plasma, eritrocitos, neutrófilos y linfocitos). Además, se va a evaluar la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno de los neutrófilos y linfocitos.
- En cuarto lugar, estudiar los efectos beneficiosos del tratamiento con oxigenoterapia en una cámara hiperbárica sobre heridas cronificadas de difícil curación, analizando la evolución de marcadores de daño oxidativo y defensas antioxidantes en plasma, así como de indicadores de angiogénesis y control vascular.
- En quinto lugar, se pretende elaborar un protocolo de prevención para evitar el embolismo arterial gaseoso durante la práctica de las actividades subacuáticas en apnea deportiva.

3. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

3. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo los experimentos de la presente tesis doctoral se ha cumplido de forma escrupulosa con los requisitos incluidos en la Declaración de Helsinki, y los protocolos seguidos han sido previamente aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica de la CAIB.

Todos los participantes en los estudios han accedido de forma voluntaria a participar tras haber sido debidamente informados del objetivo del estudio y de los posibles riesgos.

Objetivo 1. Hipoxia/reoxigenación asociada a la pesca en apnea

El entrenamiento induce procesos adaptativos en las células inmunitarias que generan tolerancia frente al estrés oxidativo. Se ha evidenciado que un episodio de isquemia-reperfusión induce cambios en las células inmunitarias que las hacen más resistentes frente a una nueva situación de isquemia-reperfusión. Para estudiar este proceso de tolerancia se ha utilizado el modelo de hipoxia-reoxigenación como inductor de estrés oxidativo en células inmunitarias. Siete profesionales de la pesca en apnea participaron en el estudio que se llevó a cabo durante el Campeonato de España de pesca submarina en Pollença (Mallorca). Los participantes llevaron a cabo tres días de entrenamiento intenso seguidos de dos días de competición. En los días de entrenamiento los pescadores permanecieron más de 75 minutos en apnea, mientras que en los dos días de competición fueron 120 minutos (en 6 horas de competición) y 44 minutos (en dos horas de competición), respectivamente. Se tomaron muestras basales antes de la primera jornada de entrenamiento, 4 horas después de la finalización de la competición y a la mañana siguiente en condiciones basales, 15 horas después de finalizar el buceo. Se ha analizado la respuesta antioxidante (actividades enzimáticas y niveles proteicos) en neutrófilos y linfocitos para evidenciar procesos adaptativos frente al estrés oxidativo, la capacidad de los neutrófilos de generar ROS, y marcadores de daño oxidativo tanto en plasma como en los dos tipos celulares purificados. En los linfocitos también se ha determinado los niveles de nitrito, como indicador de la producción de óxido nítrico, y los niveles proteicos de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa. Además, se determinó la actividad xantina oxidasa en plasma.

Objetivo 2. Oxigenoterapia hiperbárica en individuos sanos

El tratamiento con oxígeno hiperbárico provoca un incremento de la presión parcial del oxígeno en los tejidos asociado a un incremento de capacidad de transporte de oxígeno de la sangre. La presión parcial de oxígeno alcanzable mediante ésta terapia es muy superior a la que se conseguiría respirando oxígeno puro en condiciones normobáricas. Este hecho puede suponer un incremento en la producción de especies reactivas y tener influencia sobre vías de señalización dependientes del estado redox celular y sobre marcadores de estrés oxidativo. Así, se desarrolló un estudio que consistió en una exposición seca a oxígeno hiperbárico en una cámara hiperbárica (MEDISUB). En este estudio participaron 12 voluntarios físicamente activos (edad: 25.3 ± 3.9 años; índice de masa corporal: 20.7 ± 2.3 Kg/m²) que se sometieron a oxígeno 100% a una presión de 2.2 atmósferas durante 60 minutos. No había diferencias significativas en las características antropométricas en ambos grupos. Se recogieron muestras de sangre antes y 30 minutos después de finalizar la exposición hiperbárica. A partir de estas muestras se purificaron los linfocitos y neutrófilos y en ellos se determinaron las actividades de los enzimas antioxidantes, marcadores de daño oxidativo y niveles de nitrito. En linfocitos se determinó la expresión génica de la glutatión peroxidasa y la hemoxigenasa 1. Además, se determinó la capacidad oxidativa de los neutrófilos y la producción linfocitaria de H₂O₂.

Objetivo 3. Actividad física en condiciones de hiperbaria e hiperoxia asociado a una sesión de buceo con escafandra

Tras evaluar los efectos de una sesión con oxígeno hiperbárico se desarrolló un planteamiento experimental basado en la realización de una inmersión con escafandra autónoma a 40 metros de profundidad en la que se somete el organismo a una situación de hiperbaria combinada con una actividad física (sin hipoxia-reoxigenación). En este estudio participaron siete buceadores pre-profesionales con unas características antropométricas similares (edad: 26.0 ± 4.7 años; índice de masa corporal: 23.1 ± 0.6 Kg/m²). Todos los participantes eran no fumadores, y no tomaban ningún suplemento alimenticio y/o ningún medicamento dentro del mes previo al estudio. Estos buceadores llevaron a cabo una inmersión a 40 metros durante 25 minutos. Durante el tiempo que duró la inmersión los participantes respiraron una mezcla de aire atmosférico. El perfil

de la inmersión realizada es la siguiente: el descenso hasta el fondo a 40 metros tuvo una duración de 3 minutos; la permanencia en el fondo fue de 10 minutos para luego ir ascendiendo lentamente durante 5 minutos. A los 3 metros de profundidad realizaron una descompresión de 5 minutos para posteriormente salir a superficie.

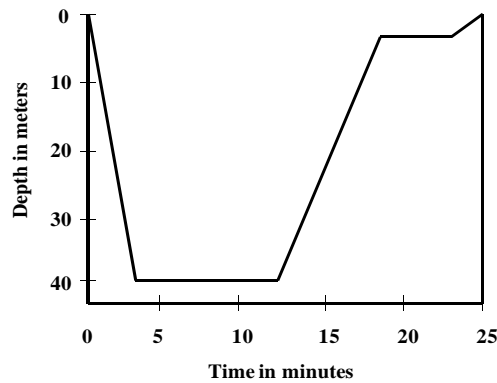


Figura 1. Esquema de la inmersión durante la inmersión con escafandra autónoma.

Se recogieron muestras de sangre venosa antes de llevar a cabo la inmersión en condiciones basales, inmediatamente después de finalizar la inmersión y tras 3 horas de recuperación. A partir de la sangre se obtuvieron el plasma, los eritrocitos, los linfocitos y los neutrófilos

En linfocitos se determinaron la actividad de los enzimas antioxidantes catalasa y glutatión peroxidasa, así como, la actividad de la caspasa-3 como indicador de apoptosis. También se determinaron los niveles de nitrito, como indicador de la producción de óxido nítrico, y de la iNOS, la producción de H_2O_2 y la expresión del gen de la hemooxigenasa 1 (HO-1).

En neutrófilos se determinaron las actividades de los enzimas antioxidantes, la actividad mieloperoxidasa (MPO) y la producción de especies reactivas de oxígeno por quimioluminiscencia, como indicadores del grado de activación de estas células inmunitarias.

En eritrocitos y en el plasma se determinaron las actividades de los enzimas antioxidantes, los niveles de nitrito y los niveles de MDA e índice de carbonilos como marcadores de la oxidación de lípidos y proteínas, respectivamente.

Como marcadores de daño celular se determinaron las actividades plasmáticas de la creatina quinasa (CK) y de la lactato deshidrogenasa (LDH).

Tras el análisis y valoración de los resultados obtenidos tras la inmersión a 40 metros, se decidió realizar una segunda inmersión, incrementando la profundidad hasta los 50 metros y con una duración total de la inmersión de 35 minutos. En este nuevo estudio participaron nueve buceadores con las siguientes características antropométricas: 33.9 ± 3.8 años de edad e índice de masa corporal de $23.4 \pm 0.7 \text{ kg/m}^2$. Los participantes permanecieron 10 minutos a 50 metros, y durante el proceso de ascensión realizaron una parada de descompresión de 3 minutos a 6 metros, seguida de una segunda de 6 minutos a 3 metros.

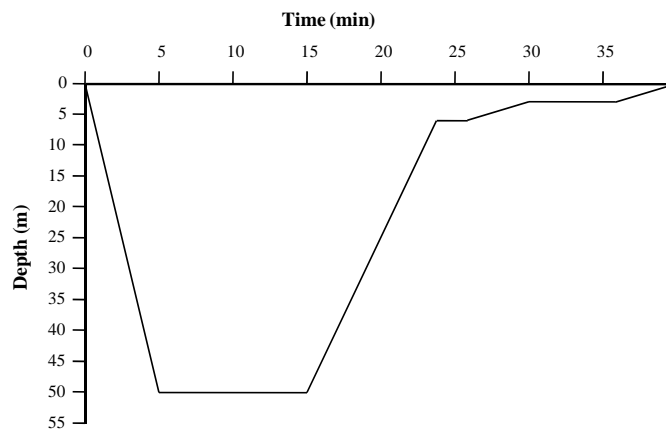


Figura 2. Esquema de la inmersión durante la inmersión con escafandra autónoma.

En este caso también se recogieron muestras de sangre venosa antes de llevar a cabo la inmersión en condiciones basales, inmediatamente tras finalizar la inmersión y tras 3 horas de recuperación. Se obtuvieron el plasma y los neutrófilos.

En el plasma se realizaron las siguientes determinaciones: actividades de la CK, LDH, los niveles de MDA y de 8oxoHG como indicadores de daño oxidativo; las actividades y niveles de proteína de enzimas antioxidantes y MPO; los niveles de nitrito; y los niveles de endotelina 1 (ET-1) y del factor de crecimiento vascular (VEGF).

En los neutrófilos se purificó el ARN y se determinó la expresión de genes relacionados con vías de señalización del óxido nítrico y de mediadores lipídicos, citoquinas y marcadores de inflamación. Además, se determinaron marcadores de daños oxidativo (malondialdehído y nitrotirosina) y la concentración de nitrito.

Objetivo 4. Oxigenoterapia en una cámara hiperbárica para heridas cronificadas

Para abordar el siguiente objetivo se seleccionaron 10 sujetos que presentaban heridas no curadas y cronificadas y, que iniciaban el tratamiento de oxigenoterapia hiperbárica para la mejora de sus lesiones. Las heridas pueden ser consecuencia de diabetes, lesiones radioinducidas o lesiones isquémicas. Los pacientes se sometieron a un tratamiento que consistía en 20 sesiones de oxigenoterapia hiperbárica continuadas (con descansos de 2 días cada 5 días, aproximadamente). Las sesiones tuvieron una duración de 80 minutos durante las que el paciente respiró oxígeno 100% dentro de una cámara hiperbárica a 2,2 ATAs de presión.

Se tomaron muestras de sangre antes de la primera sesión de terapia hiperbárica y 150 minutos después de acabarla. Además, se efectuaron tomas de muestras de sangre a los pacientes para realizar un seguimiento de los cambios inducidos por la terapia tras la quinta y última sesión.

De las muestras de sangre se obtuvieron el plasma y eritrocitos donde se realizarán las siguientes determinaciones: niveles de nitrito; las actividades enzimáticas mediante métodos espectrofotométricos de los enzimas antioxidantes; marcadores de daño oxidativo (MDA e índice de carbonilos); marcadores de daño tisular (actividades de enzimas como ALT, AST, CK, LDH); y factores de crecimiento y marcadores de angiogénesis.

Objetivo 5. Protocolo de prevención del embolismo arterial gaseoso durante la práctica de apnea deportiva.

Para la elaboración del protocolo de prevención de los accidentes de aeroembolismo se ha realizado un estudio retrospectivo y prospectivo de los casos de Accidentes disbáricos de Buceo en apnea atendidos en MEDISUB Institut de Recerca Hiperbárica durante el periodo de 1995-2013, con un total de 50 casos documentados entre Mallorca y Menorca. Este registro continua recogiendo datos a día de hoy. A partir de los datos obtenidos y analizando las características de la inmersiones realizadas se elaboró una tabla con los tiempos de estancia en superficie entre inmersiones para reducir el riesgo de sufrir accidente disbárico. Este protocolo es esencial para lograr la

eliminación de los gases acumulados durante las continuas inmersiones y recuperación de la normoxia. Tras la instauración del protocolo se ha realizado el seguimiento analizando los nuevos casos de aeroembolismo que han sucedido hasta la actualidad para determinar la utilidad de la tabla.

4. RESULTADOS

Manuscrito I

**NEUTROPHIL TOLERANCE TO OXIDATIVE STRESS INDUCED BY
HYPOXIA/REOXYGENATION**

Antoni Sureda, Joan Miquel Batle, Pere Tauler, Nuria Cases, Antoni Aguiló, Josep A.
Tur & Antoni Pons

Free Radic Res. 2004, 38(9):1003-9.

Manuscrito II

**REPETITIVE APNEA DIVING SESSIONS INDUCES AN ADAPTATIVE
ANTIOXIDANT RESPONSE IN MONONUCLEATED BLOOD CELLS**

Manuscripto II**REPETITIVE APNEA DIVING SESSIONS INDUCES AN ADAPTATIVE ANTIOXIDANT RESPONSE IN MONONUCLEATED BLOOD CELLS****ABSTRACT**

Hypoxia/reoxygenation induced by apnea diving results in oxidative stress situation. The aim was to evaluate the effects of repetitive episodes of hypoxia/reoxygenation on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) antioxidant defenses and oxidative damage and plasma xanthine oxidase activity. Seven professional apnea divers participated in the study. Blood samples were taken under basal conditions, 4h and 15h after the last dive of five consecutive days of diving apnea sessions. Glucose levels significantly increased whereas triglycerides decreased at 4h post-diving and both metabolites returned to basal values at basal 15h post-diving. Glutathione reductase activity significantly increased after 4h the diving sessions and its levels remained elevated at basal 15h post-diving. Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities progressively increased after diving with significant differences respect to initial values at basal 15h post-diving. No significant differences were observed in circulating PBMCs counts and markers of oxidative damage. Nitrite levels but not iNOS levels significantly increased 4h after diving, returning to the basal values at 15h recovery in the following day. Plasma xanthine oxidase activity was significantly increased at 4h post-diving and returned to basal values at basal 15h post-dive. In conclusion, apnea diving sessions induced PBMCs antioxidant adaptations in order to avoid oxidative damage. Chronic and repetitive episodes of diving apnea during five days increases plasma xanthine oxidase activity and NO production which could enhance the signaling role of RONS for PBMCs antioxidant adaptation front hypoxia/reoxygenation.

Keywords: hypoxia, oxidative stress, exercise, xanthine oxidase

INTRODUCTION

Diving apnea subjects the organism to successive, intermittent episodes of hypoxia and reoxygenation. The succession of episodes of reduced oxygen supply to tissues and reoxygenation may be responsible for an enhanced production of oxygen free radicals, resulting in cellular damage (Dhaliwal et al. 1991). Accordingly, cellular hypoxia and reoxygenation participate in injury caused by ischemia/reperfusion and it has been related to pathogenesis in human diseases such as sleep apnea, circulatory shock, myocardial ischemia, stroke, and organ transplantation (Li and Jackson 2002; McCord 1985). Cellular antioxidant systems have demonstrated a great adaptation to chronic exercise to avoid the oxidative damage caused by ROS produced during exercise (Gomes et al. 2012; Marin et al. 2013). In a previous study, we evidenced that chronic episodes of diving apnea produce an adaptation in neutrophils characterized by a delay in the oxidative burst response and by an increased thioredoxin reductase and glutathione reductase in order to facilitate protein reduction. Moreover, other studies reported that blood acidosis and plasma oxidative stress were reduced after three months of apnea training (Joulia et al. 2002). The lymphocyte antioxidant defences have shown adaptations to exercise-induced oxidative stress (Sureda et al. 2008). It has been reported that the expression of the antioxidant enzymes in lymphocytes is induced and regulated by ROS (Kesarwani et al. 2013; Sureda et al. 2009). However, this adaptative response of lymphocyte antioxidant defences did not avoid the oxidative damage in cellular components when the exercise is exhaustive (Tauler et al. 2006).

Oxygen availability to the hypoxic tissues is mediated by the vasodilator effects of nitric oxide (NO) (Kelm and Schrader 1990). NO is a major signaling and effector molecule mediating the response to hypoxia, because its characteristics of vasodilation (improving blood flow and oxygen supply) and modulation of energetic metabolism (reducing oxygen consumption and promoting utilization of alternative pathways) (Umbrello et al. 2013). NO mainly synthesized in endothelial cells by NO synthetases (NOS) diffuses to the lumen where execute its signaling function and it also could be eliminated by its oxidation by oxygen, resulting in the formation of nitrite (Sureda et al. 2006b). Nitrite can be reduced to NO by heme- or pterin-based enzymes and NO also can be released from stores in hypoxic conditions (Umbrello et al. 2013). This NO generation along the physiological oxygen gradient suggests a central role in vasodilatation responses to hypoxia (Datta et al. 2004; Gladwin et al. 2004).

Peripheral vasodilatation could reduce the generation of gas bubbles in the main vessels minimizing the pernicious effects of the decompressive sickness. It was evidenced that administration of a NO donor before dive protects against bubble formation in rats (Wisloff et al. 2004).

Skeletal muscle is the major source of ROS production during exercise. However, other tissues such as the heart, lungs, or blood cells also contribute to the total body generation of ROS during exercise. Xanthine oxidase oxidizes hypoxanthine to produce xanthine and generate superoxide radicals (Powers et al. 2011). Additionally, XOD is able to reduce nitrite to NO in acidic pH contributing to peripheral vasodilatation (Cantu-Medellin and Kelley 2013). The activation of xanthine oxidase could also be important in the generation of free radicals during exhaustive physical exercise in a way similar to that occurs in episodes of ischemia–reperfusion (Vina et al. 2000). Moreover, it was reported that allopurinol (an inhibitor of xanthine oxidase) reduces cellular damage and inhibits gene expression associated with exhaustive exercise (Gomez-Cabrera et al. 2006; Gomez-Cabrera et al. 2003).

We hypothesize that the repetitive episodes of hypoxia/reoxygenation in elite divers could activate plasma xanthine oxidase and consequently induce an adaptation in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), attenuating the post-dive oxidative stress. The aim of the present study was to evaluate the effects of repetitive sessions of diving apnea during a competition on PBMCs antioxidant defenses and nitric oxide production as well as on markers of cellular oxidation

MATERIALS AND METHODS

Subjects and experimental procedure

Seven voluntary male professional divers volunteered to participate in this study. Subjects were informed of the purpose of this study and the possible risks involved before giving their written consent to participate. The study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures were approved by the Ethical Committee of Clinical Investigation of the Balearic Islands. The participants performed three days of hard training and two days of competition (Spanish Championship of Fish-hunters, Pollença, Spain). The characteristics of a training day and the competition-days monitored with a dive computer are reported in Table I.

Venous blood samples were taken from the antecubital vein with suitable vacutainers with EDTA as anticoagulant. Samples were taken the morning previous to the beginning of the training sessions (basal pre-diving competition) after overnight fasting, 4 h after ending the competition (4h-post-diving competition) and 15 h after ending competition in the following morning in basal conditions (basal post-diving competition). Blood samples were used to purify PBMCs and to obtain plasma (Sureda et al. 2006b). Hematological parameters were determined in an automatic flow cytometer analyser Technicon H2 (Bayer) VCS system. Biochemical parameters were determined by standardized clinical methods using an autoanalyzer DAX-72 (Technicon, Bayer). Antioxidant enzyme activities, markers of oxidative damage and nitrite production were determined in PBMCs. Xanthine oxidase activity was also

PBMCs enzyme activities

Antioxidant enzyme activities were determined in PBMCs with a Shimadzu UV-2100 spectrophotometer at 37°C. Catalase (CAT) activity was measured by the spectrophotometric method of Aebi using H₂O₂ as substrate (Aebi 1984). Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured using the spectrophotometric method of Flohé and Gunzler (Flohe and Gunzler 1984). This assay required H₂O₂ and NADPH as substrates and glutathione reductase as enzyme indicator. Glutathione reductase (GRd) activity was measured by the Goldberg and Spooner spectrophotometric method using oxidized glutathione as the substrate (Goldberg and Spooner 1984). Superoxide dismutase (SOD) activity was measured using a xanthine/xanthine oxidase system to generate the superoxide anion (Flohe and Otting 1984). This anion produced the reduction of cytochrome C, which was monitored at 550 nm. The superoxide dismutase in the sample removed the superoxide anion and produced an inhibition of the cytochrome c reduction.

PBMCs oxidative stress markers

Malondialdehyde (MDA) as a marker of lipid peroxidation was analysed in PBMCs using a colorimetric assay specific for MDA determination. Briefly, samples and standards were placed in glass tubes containing the chromogenic agent n-methyl-2-phenylindole (10.3 mM) in acetonitrile:methanol (3:1). HCl (12 N) was added, and the samples were incubated for 1 hour at 45°C. The condensation of one molecule of MDA with two molecules of this chromogen yields a stable chromophore with maximal

absorbance at 586 nm. MDA concentration was calculated using a standard curve of known concentration.

Protein Carbonyl derivatives were measured by an adaptation of the method of Levine (Levine et al. 1994). Samples deproteinised with trichloroacetic acid were resuspended with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 10mM, and incubated for 60 min at 37°C. Then, samples were precipitated with 20% trichloroacetic acid, and centrifuged for 10 min at 1000g at 4°C. The precipitate was washed twice with ethanol–ethyl acetate (1:1; v/v) to remove free DNPH. Guanidine 6M in phosphate buffer 2mM, pH 2.3 was added to the precipitate, and samples were incubated for 40 min at 37°C and absorbance was measured at 360 nm. The molar absorption of $22,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ was used to quantify the levels of protein carbonyl.

PBMCs nitrite determination

Nitrite levels were determined in PBMCs by the acidic Griess reaction using a spectrophotometric method (Suredda et al. 2006b). Cell samples were centrifuged for 10 min at 900xg at 4°C. Supernatants were collected and deproteinized with acetone and kept overnight at -20°C. Samples were centrifuged for 10 min at 15000xg at 4°C, and supernatants were recovered. A 96-well plate was loaded with the samples or standard nitrite solutions (100 µl) in duplicate. 50 µl sulfanilamide (2% w/v) in 5% HCl was added to each well, and 50 µl N-(1-naphthyl)-ethylenediamine (0.1% w/v) in water was then added. Absorbance was measured at 540 nm following an incubation of 30 min. Nitrite concentration was calculated with a standard curve of known concentration.

iNOS protein determination

iNOS protein levels were determined in PBMCs by ELISA using polyclonal antibody Antihuman iNOS (Stressgen) (Suredda et al. 2006b). Suitable dilutions of the PBMCs suspensions and iNOS standard were placed in each well of the plate per duplicate (Polystyrene Assay Plate, Costar). The plate was incubated at 37°C for 3 h. A solution of 1% bovine albumin was added into each well and the plate was incubated (37 °C for 3 h) to saturate all binding protein sites. The plate was then washed 4 times with NaCl 0.9%–Tween 20. The commercial antibody (diluted 1000-fold) was placed into each well and the plate was newly incubated for 3 h at 37°C. The plate was then washed as above. The secondary antibody against the IgG chain, conjugated to alkaline phosphatase (diluted 500-fold), was placed into each well and the plate was incubated in

the same conditions as above. The wells were newly washed and the phosphatase substrate solution was added. Finally, absorbance was measured at 405 nm.

Determination of xanthine oxidase activity

Amplex® Red Xanthine/Xanthine Oxidase Assay Kit (Molecular Probes) was used to determine xanthine oxidase activity in human plasma as described by the manufacturer.

Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out using a statistical package for social sciences (SPSS 19.0 for windows). Results were expressed as means \pm SEM and $P < 0.05$ was considered statistically significant. Kolmogorov-Smirnov normality test revealed that the data for all the variables was normally distributed. One-way ANOVA was then used to determine the significance of changes in all parameters measured. .

RESULTS

The effects of diving apnea on hematological and biochemical parameters are reported in Table 1. The only parameters significantly affected by scuba diving were the levels of glucose and triglycerides ($p < 0.05$). Glucose levels significantly increased whereas triglycerides decreased at 4h post-diving. Both metabolites returned to basal values at basal 15h post-diving.

Changes in PBMCs counts, antioxidant enzymes and oxidative damage markers are presented in Table 2. No significant differences were observed in circulating PBMCs and markers of oxidative damage (MDA and protein carbonyl derivatives). GRd activity significantly increased after the diving sessions and its levels remained elevated at basal post-diving ($p < 0.05$). Catalase, GPx and SOD activities progressively increased, although the differences were only significantly different respect to initial values at basal post-diving ($p < 0.05$).

PBMCs iNOS protein levels and nitrite production are reported in Table 3. No significant effects induced by scuba diving were evidenced in PBMCs iNOS protein levels. Nitrite levels, as a marker of nitric oxide production, significantly increased after diving ($p < 0.05$), returning to the basal values at recovery in the following day.

Plasma xanthine oxidase activity is presented in Figure 1. The enzymatic activity was significantly increased at post-diving (98% increase, $p < 0.05$). The xanthine oxidase activity returned to basal values at basal post-dive.

DISCUSSION

Repetitive sessions of diving apnea during consecutive five days combine successive episodes of hypoxia and reoxygenation and the practice of physical activity. This activity results in increased nitrite levels and plasma xanthine oxidase activity and in the activation of PBMCs antioxidant defenses. It is well established that splenic contraction associated with apnea is a physiological response that causes an increase in hemoglobin concentration and hematocrit, promoting a prolonged breath-holding (Richardson et al. 2012). In the present results the increment in both parameters was not statistically significant. The divers that participate in the study are professional well-trained and perform many dives along the year and this could minimize the hematological response to apnea diving. Glucose levels were significantly reduced whereas triglycerides were increased after 250 min of continuous apnea diving. Diving for more than 4 hours mobilizes the energetic reserves in order to maintain the performance all over the competition day.

Xanthine oxidase activity was increased after diving suggesting a role in the instauration of oxidative stress during the apnea diving. However, xanthine oxidase-derived ROS formed during exhaustive exercise such as a marathon race are also responsible for nuclear factor- $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$) activation because, the treatment with allopurinol prevents NF $\kappa\beta$ activation and, the subsequent up-regulation of the expression of antioxidant enzymes. In accordance, this xanthine oxidase activation could participate in the PBMCs antioxidant adaptation induced by repetitive sessions of apnea diving. Moreover, it was reported that the prevention of ROS formation by inhibition of xanthine oxidase with allopurinol protects against cell damage caused by exhaustive exercise (Gomez-Cabrera et al. 2003). ROS produced during exercise and also during apnea diving work as signals that regulate cellular adaptations to exercise but also could be responsible of causing oxidative damage acting as a double-edged sword.

The increased ROS production associated to repetitive episodes of hypoxia-reoxygenation could induce an antioxidant response in PBMCs in order to avoid

oxidative damage. It was reported that increased ROS production induce the synthesis of antioxidant enzymes such as SOD in lymphocytes (Khassaf et al. 2003; Tauler et al. 2003). In a previous study we evidenced that an acute session of apnea diving during 4 hours is able to increase SOD activity in lymphocyte after 1 hour of recovery (Sureda et al. 2006a). Modest changes in antioxidant system were also obtained in previous studies after static and dynamic apneas (Joulia et al. 2003; Joulia et al. 2002). However, in the present study the stimulus is greater as the divers performed around 300 immersions during the five days monitored, resulting in a significant antioxidant response. GR was the enzyme with the highest increase and this enzyme is important because it recycles glutathione in order to maintain the cellular redox status. GSH is the most abundant cellular thiol and it is involved in several metabolic processes playing a central role in the detoxification of ROS (DeLeve and Kaplowitz 1991). The PBMCs adaptative response is enough to avoid cellular damage as it was evidenced with the lack of changes in MDA and protein carbonyl derivatives.

Cellular nitrite concentration has been used as an indicator of NO production (Dejam et al. 2005). Nitric oxide synthesized by endothelial NOS plays an essential role in the regulation of vascular tone and blood flow. Nitric oxide could be also synthesized from nitrite through its reduction by enzymes such as xanthine oxidase or hemoglobin in hypoxic conditions (Cantu-Medellin and Kelley 2013). PBMCs present the inducible isoform of NOS (iNOS) which produces high-levels of NO when cells are activated. NO produced by PBMCs has a role as a toxic defense molecule against infectious organisms but also regulates the functional activity, growth and death of many immune cells. In accordance, it has been demonstrated that NO up-regulates SOD expression and activity and induced anti-apoptotic effects in human neutrophils (Keller et al. 2003; Su et al. 2011). The increased NO production after diving could be related to the PBMCs antioxidant response in order to minimize oxidative damage which was evidenced with a significant increase in antioxidant enzymes at basal post-diving (Keller et al. 2003; Roozendaal et al. 2002). However, the iNOS protein levels were unchanged at post-diving indicating that the increased NO production derives from a direct activation of the enzyme or from other source as the reduction of nitrite by xanthine oxidase.

In conclusion, repetitive episodes of diving apnea result in a PBMCs antioxidant adaptation mainly evidenced 15h after diving that could protect PBMCs from the oxidative stress generated by chronic hypoxia/reoxygenation. Xanthine oxidase could

play a role in increasing RONS during diving and in promoting the activation of cellular protective mechanisms.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by the Spanish Ministry of Health and Consumption Affairs (Programme of Promotion of Biomedical Research and Health Sciences, Projects 05/1276, 08/1259, and 11/01791, Red Predimed-RETIC RD06/0045/1004, and CIBERobn CB12/03/30038), Grants of support to research groups no. 35/2011 and 23/2012 (Balearic Islands Gov. and EU FEDER funds).

REFERENCES

- Aebi HE (1984) Catalase. *Methods in Enzymatic Analysis*: pp 273-286.
- Cantu-Medellin N, Kelley EE (2013) Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biol* 1: 353-358
- Datta B, Tufnell-Barrett T, Bleasdale RA, Jones CJ, Beeton I, Paul V, Frenneaux M, James P (2004) Red blood cell nitric oxide as an endocrine vasoregulator: a potential role in congestive heart failure. *Circulation* 109: 1339-1342
- Dejam A, Hunter CJ, Pelletier MM, Hsu LL, Machado RF, Shiva S, Power GG, Kelm M, Gladwin MT, Schechter AN (2005) Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood* 106: 734-739
- DeLeve LD, Kaplowitz N (1991) Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 52: 287-305
- Dhaliwal H, Kirshenbaum LA, Randhawa AK, Singal PK (1991) Correlation between antioxidant changes during hypoxia and recovery on reoxygenation. *Am J Physiol* 261: H632-638
- Flohe L, Gunzler WA (1984) Assays for glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114-121.
- Flohe L, Otting F (1984) Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 105: 93-104
- Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP (2004) The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med* 36: 707-717
- Goldberg DM, Spooner RJ (1984) Glutathione reductase. In: Bergmeyer, H.U., ed, *Methods in Enzymatic Analysis* (Verlag Chemie, Basel), pp 258-265. *Methods in Enzymatic Analysis*: 00 258-265.
- Gomes EC, Silva AN, de Oliveira MR (2012) Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. *Oxid Med Cell Longev* 2012: 756132
- Gomez-Cabrera MC, Martinez A, Santangelo G, Pallardo FV, Sastre J, Vina J (2006) Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr* 96 Suppl 1: S31-33
- Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV, Sastre J, Vina J, Garcia-del-Moral L (2003) Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *Jama* 289: 2503-2504

- Joulia F, Steinberg JG, Faucher M, Jamin T, Ulmer C, Kipson N, Jammes Y (2003) Breath-hold training of humans reduces oxidative stress and blood acidosis after static and dynamic apnea. *Respir Physiol Neurobiol* 137: 19-27
- Joulia F, Steinberg JG, Wolff F, Gavarry O, Jammes Y (2002) Reduced oxidative stress and blood lactic acidosis in trained breath-hold human divers. *Respir Physiol Neurobiol* 133: 121-130
- Kelm M, Schrader J (1990) Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res* 66: 1561-1575
- Keller T, Pleskova M, McDonald MC, Thiernemann C, Pfeilschifter J, Beck KF (2003) Identification of manganese superoxide dismutase as a NO-regulated gene in rat glomerular mesangial cells by 2D gel electrophoresis. *Nitric Oxide* 9: 183-193
- Kesarwani P, Murali AK, Al-Khami AA, Mehrotra S (2013) Redox regulation of T-cell function: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 18: 1497-1534
- Khassaf M, McArdle A, Esanu C, Vasilaki A, McArdle F, Griffiths RD, Brodie DA, Jackson MJ (2003) Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *J Physiol* 549: 645-652
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233: 346-357.
- Li C, Jackson RM (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C227-241
- Marin DP, Bolin AP, Campoio TR, Guerra BA, Otton R (2013) Oxidative stress and antioxidant status response of handball athletes: implications for sport training monitoring. *Int Immunopharmacol* 17: 462-470
- McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163
- Powers SK, Nelson WB, Hudson MB (2011) Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med* 51: 942-950
- Richardson MX, Engan HK, Lodin-Sundstrom A, Schagatay E (2012) Effect of hypercapnia on spleen-related haemoglobin increase during apnea. *Diving Hyperb Med* 42: 4-9
- Roozendaal R, Kauffman HF, Dijkhuis AJ, Ommen ET, Postma DS, de Monchy JG, Vellenga E (2002) Interaction between nitric oxide and subsets of human T lymphocytes with differences in glutathione metabolism. *Immunology* 107: 334-339

- Su SH, Jen CJ, Chen HI (2011) NO signaling in exercise training-induced anti-apoptotic effects in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 405: 58-63
- Sureda A, Batle JM, Tauler P, Ferrer MD, Tur JA, Pons A (2006a) Vitamin C supplementation influences the antioxidant response and nitric oxide handling of erythrocytes and lymphocytes to diving apnea. *Eur J Clin Nutr* 60: 838-846
- Sureda A, Ferrer MD, Tauler P, Romaguera D, Drobnic F, Pujol P, Tur JA, Pons A (2009) Effects of exercise intensity on lymphocyte H₂O₂ production and antioxidant defences in soccer players. *Br J Sports Med* 43: 186-190
- Sureda A, Ferrer MD, Tauler P, Tur JA, Pons A (2008) Lymphocyte antioxidant response and H₂O₂ production after a swimming session: gender differences. *Free Rad Res* 42: 312-319
- Sureda A, Tauler P, Aguilo A, Fuentespina E, Cordova A, Tur JA, Pons A (2006b) Blood cell NO synthesis in response to exercise. *Nitric Oxide* 15: 5-12
- Tauler P, Aguilo A, Gimeno I, Noguera A, Agusti A, Tur JA, Pons A (2003) Differential response of lymphocytes and neutrophils to high intensity physical activity and to vitamin C diet supplementation. *Free Rad Res* 37: 931-938
- Tauler P, Sureda A, Cases N, Aguilo A, Rodriguez-Marroyo JA, Villa G, Tur JA, Pons A (2006) Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *J Nutr Biochem* 17: 665-671
- Umbrello M, Dyson A, Feelisch M, Singer M (2013) The Key Role of Nitric Oxide in Hypoxia: Hypoxic Vasodilation and Energy Supply-Demand Matching. *Antioxid Redox Signal*
- Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J (2000) Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50: 271-277
- Wisloff U, Richardson RS, Brubakk AO (2004) Exercise and nitric oxide prevent bubble formation: a novel approach to the prevention of decompression sickness? *J Physiol* 555: 825-829

Table 1. Effects of diving apnea on hematological and biochemical parameters

	Basal pre-diving competition	4h post-diving competition	Basal 15h post- diving competition
Erythrocytes ($10^6/\mu\text{l}$)	4.93 ± 0.07	5.02 ± 0.09	4.86 ± 0.13
Hemoglobin (g/dL)	14.7 ± 0.1	14.9 ± 0.2	14.3 ± 0.3
Hematocrit (%)	42.8 ± 0.4	43.5 ± 0.6	42.3 ± 0.8
Glucose (mg/dL)	92.0 ± 2.8	76.0 ± 8.3 *	94.4 ± 2.9
Triglycerides (mg/dL)	68.7 ± 8.8	103 ± 16 *	50.2 ± 6.9
Total Cholesterol (mg/dL)	180 ± 6	175 ± 8	174 ± 9
HDL-C (mg/dL)	60.0 ± 3.1	55.1 ± 2.0	56.8 ± 2.5
LDL-C (mg/dL)	106 ± 5	99.1 ± 8.1	107 ± 9

Hematological and biochemical parameters in plasma samples of professional divers (n=7) before (basal) and 4 and 15 hours after apnea diving sessions (One way ANOVA). $P < 0.05$, * indicates differences respect to the basal pre-diving competition.

Table 2. Effects of diving apnea on peripheral blood mononuclear cell counts, antioxidant enzymes and oxidative damage markers

	Basal pre-diving competition	4h post-diving competition	Basal 15h post-diving competition
PBMCs ($10^3/\mu\text{l}$)	2.22 ± 0.16	2.51 ± 0.14	2.40 ± 0.18
<i>Oxidative damage markers</i>			
MDA ($\mu\text{mol}/10^9$ cell)	2.77 ± 0.24	3.37 ± 0.22	2.68 ± 0.25
Carbonyl derivatives ($\mu\text{mol}/10^9$ cell)	20.8 ± 2.1	23.4 ± 3.4	23.3 ± 2.6
<i>Antioxidant enzyme activities</i>			
Catalase ($\text{K}/10^9$ cell)	14.0 ± 1.2	14.4 ± 0.9	18.3 ± 0.5 *
GPx ($\text{nKat}/10^9$ cell)	34.2 ± 2.1	38.0 ± 1.7	42.3 ± 1.1 *
GRd ($\text{nKat}/10^9$ cell)	29.9 ± 2.4	40.4 ± 4.7 *	39.8 ± 3.1 *
SOD ($\text{pKat}/10^9$ cell)	15.9 ± 1.2	15.1 ± 0.8	19.4 ± 0.7 *

Effects of diving apnea on peripheral blood mononuclear cell counts, antioxidant enzymes and oxidative damage markers in plasma samples of professional divers (n=7) before (basal) and 4 and 15 hours after apnea diving sessions (One way ANOVA). $P < 0.05$, * indicates differences respect to the basal pre-diving competition.

Table 3. Effects of diving apnea on lymphocyte iNOS levels and nitrite production

	Basal pre-diving competition	4h post-diving competition	Basal 15h post- diving competition
iNOS (ng/10⁶ cells)	124 ± 14	116 ± 12	121 ± 10
Nitrite (nmol/10⁹ cells)	37.8 ± 1.3	46.9 ± 3.1 *	39.6 ± 2.2

Effects of diving apnea on lymphocyte iNOS levels and nitrite production in plasma samples of professional divers (n=7) before (basal) and 4 and 15 hours after apnea diving sessions (One way ANOVA). $P < 0.05$, * indicates differences respect to the basal pre-diving competition.

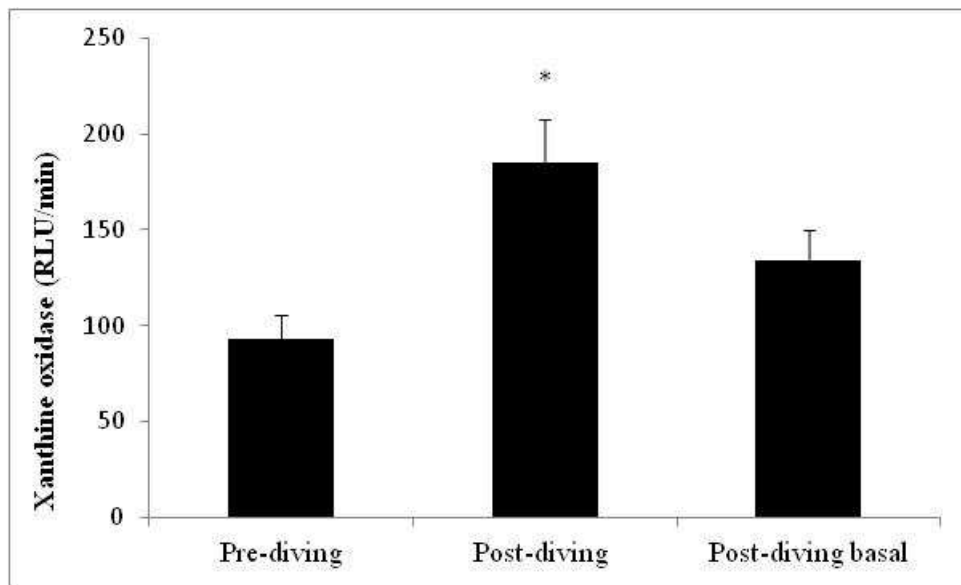


Figure 1. Effects of diving apnea on xanthine oxidase activity in plasma samples of professional divers (n=7) before (pre-diving) and 4 (post-diving) and 15 (post-diving basal) hours after apnea diving sessions (One way ANOVA). $P < 0.05$, * indicates differences respect to the basal pre-diving competition.

Manuscrito III

**SCUBA DIVING ENHANCES ENDOGENOUS ANTIOXIDANT DEFENSES IN
LYMPHOCYTES AND NEUTROPHILS**

Miguel D. Ferrer, Antoni Sureda, Juan M. Batle, Josep A. Tur & Antoni Pons

Free Radic Res. 2007, 41(3):274-81.

Manuscrito IV

**SCUBA DIVING INCREASES ERYTHROCYTE AND PLASMA
ANTIOXIDANT DEFENSES AND SPARES NO WITHOUT OXIDATIVE
DAMAGE**

Antoni Sureda, Miguel D Ferrer, Joan M Batle, Pedro Tauler, Josep A Tur & Antoni
Pons

Med Sci Sports Exerc. 2009, 41(6):1271-6.

Manuscrito V

SCUBA DIVING ACTIVATES VASCULAR ANTIOXIDANT SYSTEM

Antoni Sureda, Joan M. Batle, Miguel D. Ferrer, Antònia Mestre-Alfaro, Josep A. Tur
& Antoni Pons

Int J Sports Med. 2012, 33(7):531-6.

Manuscrito VI

**SCUBA DIVING INDUCES NITRIC OXIDE SYNTHESIS AND THE
EXPRESSION OF INFLAMMATORY AND REGULATORY GENES OF THE
IMMUNE RESPONSE IN NEUTROPHILS**

Manuscripto VI**SCUBA DIVING INDUCES NITRIC OXIDE SYNTHESIS AND THE EXPRESSION OF INFLAMMATORY AND REGULATORY GENES OF THE IMMUNE RESPONSE IN NEUTROPHILS****Abstract**

Scuba diving hyperoxia increases reactive oxygen species production which acts as signaling molecules for a variety of growth factors, cytokines and hormones. The aim was to study the effects of scuba diving immersion on neutrophil inflammatory response, the induction of nitrosative damage and the NO synthesis. Nine male divers performed an immersion at 50 m depth for a total time of 35 min. Blood samples were obtained before diving at rest, immediately and 3 h after the fifth consecutive diving day. The neutrophil gene expression of IL-6, IL-8, IL-10, IL-1b, HSP72, COX-2, 5-LOX, iNOS, TLR4 and NF κ B but not the expression of TNF α , MPO and TLR2 significantly increased after the recovery period respect to pre- and post-dive levels. NF κ B, IL-6 and TLR4 gene expression reported significant differences immediately after diving respect to the pre-dive values. Protein-nitrotyrosine levels significantly rose after diving and remained high during recovery, whereas no significant differences were reported in MDA. Neutrophil nitrite levels progressively increased after diving and recovery. The iNOS protein levels maintained the basal values in all situations. In conclusion, scuba diving induces nitric oxide synthesis, nitrosative damage and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response of neutrophils.

Keywords: Oxidative stress, scuba diving, hyperbaric oxygen, nitric oxide, inflammation

INTRODUCTION

Scuba diving is characterized by hyperoxia resulting from hyperbaric exposure during diving and oxygen availability at high pressure, both of which could induce oxidative stress by increasing reactive oxygen and nitrogen species (RONS) production. Moreover, divers are exposed to several environmental stressors during dives with compressed air such as hyperoxia, formation of intravascular nitrogen bubbles, exercise and psychological stress that may contribute to an oxidative stress situation (Obad et al. 2007). RONS also act as signaling molecules in transduction cascades, or pathways, for a variety of growth factors, cytokines and hormones (Ferrer et al. 2010; Jackson et al. 2002). In fact, the clinical use of hyperbaric oxygen (HBO) which involves the administration of 100 % oxygen at more than one atmosphere has been successfully used as an adjunctive therapy for several ischemia/reperfusion injuries (Feldmeier 2003; Tibbles and Edelsberg 1996). RONS can be considered as a double-edged sword because they serve as key signal molecules in physiological processes but they also play a role in pathological processes (Ferrer et al. 2010), depending on their concentration and intracellular localization. Nitric oxide can also exert damaging and signaling effects; it produces the toxic peroxynitrite that can alter the function of proteins (Afanas'ev 2007) or contribute to kill exogenous pathogens (Ferrari et al. 2011). On the other hand, nitric oxide inhibit neutrophil adherence to the endothelium (Conger and Weil 1995; Vinten-Johansen et al. 1999) via inhibiting expression of adhesion molecules following a dive (De Caterina et al. 1995; Ohashi et al. 1997)

It is well established that contracting skeletal muscles release cytokines, which work in a hormone-like fashion, exerting specific endocrine effects regulating the energy supply with especially strong effects on adipose tissue (Febbraio and Pedersen 2002). Typically, IL-6 is the first cytokine released into the circulation during exercise followed by a systemic anti-inflammatory response. The circulating levels of well-known anti-inflammatory cytokines such as IL-1ra and IL-10 also increase after exercise (Febbraio and Pedersen 2002; Pedersen et al. 2007). Classical pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and IL-1 β , in general do not increase with exercise, indicating that the cytokine cascade induced by exercise is markedly different from the cytokine cascade induced by infections (Pedersen and Febbraio 2012). Acute exercise results in a rapid mobilization and accumulation of neutrophils in muscle related to both the intensity and duration of exercise (Walsh et al.

2011). Neutrophils may be activated during exercise by a variety of factors including muscle damage, growth hormone and IL-6. Neutrophils express in the membrane surface toll-like receptors (TLRs), a highly conserved proteins that play an important role in the detection and recognition of microbial pathogens (Mantovani et al. 2011). The recognition of pathogens by TLRs triggers intracellular signaling pathways resulting in the activation of an immune response which includes the production cytokines (Gleeson et al. 2006). In addition, it has been evidenced that hyperoxia and exercise induced intracellular ROS production that can up-regulate TLRs expression in several cell types, leading to the release of cytokines (Francaux 2009; Zbinden-Foncea et al. 2012). Neutrophils once activated, could phagocyte cellular debris and release growth factors that recruit other inflammatory cells such as macrophages which are involved in removing residual cell fragments and in reconstructing muscle fiber (Geering et al. 2013).

In a previous studies we evidenced that scuba diving induced a leukocyte infiltration and oxidative stress and also activated an antioxidant response in order to improve the resistance to diving-derived oxidative damage. As hyperoxia and hyperbaria alter the oxidative stress equilibrium we suspected that a single scuba dive session could activate the production of cytokines and other proteins related to the inflammatory response by immune cells. The aim of the present study was to determine the effects of a single scuba dive to a great depth on the neutrophil inflammatory response. We also determined the induction of oxidative damage in the neutrophil, the gene expression of TLR 2 and 4 and the NO synthesis.

MATERIAL AND METHODS

Subjects and study protocol

Nine male professional divers were recruited for this investigation (33.9 ± 3.8 years; body mass index (BMI) = 23.4 ± 0.7 kg/m²). All experimental procedures in the study were completed in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by Ethical Committee of Clinical Investigation of the CAIB (Palma de Mallorca, Balearic Islands, Spain). The subjects were non-smokers and did not take any antioxidant dietary supplement or any routine medication for 1 month before the study. Subjects were informed of the purpose and demands of the study before giving their written consent to

participate. Prior to the immersion, all sportsmen passed a physical and medical test in the laboratory to ensure a good performance when doing this sport.

Divers performed an immersion at a depth of 50 m for a total time of 35 min in which they breathed atmospheric air. The diving profile was a direct descent to 50 m with a total bottom time of 10 min, and the return to the surface was carried out with a decompression of 3 min at a depth of 6 m and another one of 6 min at 3 m. Participants continuously swam while at depth in order to represent a sustained moderate exercise. Divers had refrained from any diving and swimming activities during the 48 h preceding the dive.

Experimental procedure

Venous blood samples were obtained from the antecubital vein of divers in suitable vacutainers. Blood samples were obtained before the diving session after overnight fasting (basal), 30 min after diving (post-diving) and after a recovery period of 3 h (recovery). Neutrophil counts were performed on whole blood in an automatic flow cytometer analyser (Techicon H2 (Bayer®) VCS system). Neutrophils were obtained from the blood following Boyum's method (Boyum, 1964). A known blood volume was carefully introduced on Ficoll in a proportion of 1.5:1 and was then centrifuged at 900 g, 18°C for 30 min. The precipitate containing the erythrocytes and neutrophils was incubated at 4°C with 0.15 M ammonium chloride to hemolyze the erythrocytes. The suspension was centrifuged at 750 g, 4 °C for 15 min, and the supernatant was then discarded. The neutrophil phase at the bottom was washed first with ammonium chloride and then with phosphate buffer saline, pH 7.4. An aliquot of the purified neutrophils was used for mRNA extraction. The rest of neutrophils were lysed with distilled water for biochemical assays.

Determination of Nitrite

Nitrite levels were determined in neutrophils by acidic Griess reaction using a spectrophotometric method. Lysed neutrophils were deproteinized with acetone and kept overnight at -20 °C. Samples were centrifuged for 10 min at 15,000 g, 4 °C, and supernatants were recovered. A 96-well plate was loaded with samples or nitrite standard solutions (100 µl) in duplicate. Fifty l sulfanilamide (2% w/v) in 5% HCl was added to each well, and 50 µl N-(1-naphthyl)-ethylenediamine (0.1% w/v) in water was then added. The absorbance at 540 nm was measured after 30 min of incubation.

MDA determination

Malondialdehyde (MDA) as a marker of lipid peroxidation was analysed in neutrophils using a colorimetric assay specific for MDA determination. Briefly, samples and standards were added to glass tubes containing the chromogenic agent n-methyl-2-phenylindole (10.3 mM) in acetonitrile:methanol (3:1). HCl (12 N) was added, and the samples were incubated for 1 hour at 45°C. The condensation of one molecule of MDA with two molecules of this chromogen yields a stable chromophore with maximal absorbance at 586 nm. MDA concentration was calculated using a standard curve of known concentration.

Assay of Protein-Nitrotyrosine

Nitrotyrosine (Cell Biolabs, Inc., Ref. STA-305) was determined in neutrophil lysates by competitive enzyme immunoassay following manufacturer instructions. The unknown protein sample or nitrated bovine serum albumin (BSA) standards were added to a nitrated BSA preabsorbed EIA plate. After a brief incubation, an antinitrotyrosine antibody was added, followed by a horseradish (HRP) conjugated secondary antibody. The nitrotyrosine content in samples was determined by comparing with a standard curve prepared from predetermined nitrated BSA standards. The detection sensitivity limit was 20 nM. The intra-assay coefficient of variation and the interassay coefficient of variation were 6% and 10.5%, respectively.

Gene Expression

The gene expression of was determined by real-time polymerase chain reaction (PCR) with 18S ribosomal as the reference gene. First, mRNA was isolated from neutrophils by phenol-chloroform extraction (Tripure Isolation Reagent, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). cDNA was synthesized from 1 mg total RNA using reverse transcriptase with oligo-dT primers. Quantitative PCR was performed using a LightCycler instrument (Roche Diagnostics) with DNA-master SYBR Green I. Target cDNAs were amplified as follows: 10 min, 95 °C followed by 40 cycles of amplification. The specific primers and amplification conditions used for each gene are presented in Table 1. mRNA levels previous to the dive were arbitrarily referred to as 1.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using a statistical package for social sciences (SPSS 19.0 for Windows®). Results are expressed as mean \pm SEM and $p < 0.05$ was considered statistically significant. A Shapiro-Wilk W-test was applied to assess the normal distribution of the data, thus preventing a type 2 error test. The statistical significance of the data was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA). When significant differences were found, DMS post-hoc testing was used to determine the differences between the groups involved.

RESULTS

Neutrophil counts and markers of nitric oxide production, oxidative and nitrosative damage are presented in Table 2. Circulating neutrophils were significantly increased at recovery, three hours after diving. In order to evidence the presence of oxidative damage induced by the scuba diving session we measured neutrophil MDA as a marker of lipid peroxidation and protein-nitrotyrosine as a marker of nitrosative damage. Protein-nitrotyrosine levels significantly rose after diving and remained high during recovery, whereas no significant differences were reported in MDA values. Neutrophil nitrite levels as indicative of NOS activity progressively increased after diving and recovery, reporting significant differences after 3h recovery respect to pre-dive concentration. The iNOS protein levels maintained the basal values in all situations.

The expression of genes related with the signaling pathway and synthesis of nitric oxide and lipid mediators is reported in Table 3. The expression of TLR4 (1.8 times higher than pre-dive) and NF κ B (1.5 times higher) were significantly increased immediately after the diving session. Neutrophil expression of TLR4 (2.5 times higher), NF κ B (1.9 times higher), COX-2 (3.6 times higher), 5-LOX (2 times higher), and iNOS (1.5 times higher) were significantly increased 3 hours after diving respect to the pre- and post-dive values. TLR2 gene expression was unchanged in all situations.

The expression of genes related with the neutrophil cytokine synthesis and inflammation is reported in Table 4. IL-6 is the only cytokine that significantly increased its expression in neutrophils immediately after diving. A significant higher expression of IL-6 (3.5 times), IL-8 (2.9 times), IL-10 (2.3 times) and IL 1b (2.0 times)

and HSP72 (1.9 times) three hours after diving than basal were reported, whereas MPO and TNF- α maintained the basal mRNA level.

DISCUSSION

Scuba diving combines a situation of physical activity with hyperbaria and high oxygen availability. Scuba diving at 50 meters deep was enough to induce a neutrophil mobilization suggesting the initiation of an inflammation-like response, similar to the occurred after infection or after acute intense exercise (Cannon and Blumberg 2000; Shek and Shephard 1998; Sureda et al. 2013). In accordance, it was evidenced in a previous study an increase in the number of circulating neutrophils after a single dive to 54 m for 20 min of bottom time (Glavas et al. 2008). These situations increase ROS generation, leading to oxidative stress and tissue damage, but ROS can also induce the expression of antioxidant genes as catalase, HO-1, UCP-3, iNOS and PGC-1 α (Ferrer et al. 2010). The protein-nitrotyrosine, marker of nitrosative damage and peroxynitrite production, increases after scuba diving in accordance with an increase of nitrite concentration, marker of nitric oxide production. This increase in nitric oxide started immediately after the scuba diving session but was statistically significant only after 3 h of recovery; however, the increased nitric oxide production after scuba diving is independent of the amount of iNOS present in neutrophils. It probably could be result of a more substrate (L-arginine), co substrate (NADPH) neutrophil availabilities and of a more nitric oxide synthetase activity after scuba diving than in basal conditions. The iNOS gene increases the expression three hours after scuba diving but the iNOS protein maintain the basal levels at this moment, indicating that the recovery time was not enough to reflect the gene induction in the iNOS protein levels and supporting a direct activation of the enzyme. iNOS gene expression is induced by NF κ B activation (Ji et al. 2006); the expression of this regulatory gene is increased immediately after scuba diving, previously to the increased expression of iNOS gene. The increased protein-nitrotyrosine levels immediately after diving reflects that the peroxynitrite production starts immediately after diving. Peroxynitrite is the results of the reaction between nitric oxide and super oxide anion (Bouayed and Bohn 2010); then, it also reflects an increased production of superoxide anion after diving. However, the MDA levels as a marker of oxidative damage remained unchanged in neutrophils indicating an adaptive

response to diving –induced hyperoxia to preserve the lipid peroxidation or to quickly eliminate its products of oxidation.

The NF κ B, IL-6 and TLR4 expression are firstly and highly increased after diving; whereas the increase in the gene expression of IL-8, IL10, IL-1b, HSP72, iNOS, COX-2 and 5-LOX is produced later. Probably, this secondary gene expression could be consequence to increased expression, activation and nuclear migration of NF κ B. NF κ B is a redox-sensitive transcription factor that may be activated by ROS, which also, stimulates the expression of several inflammation-related genes such as IL-6 (Sen and Packer 1996), eicosanoic metabolism genes (Tsatsanis et al. 2006) and several enzymes such as Mn-SOD or iNOS (Gomez-Cabrera et al. 2008). Toll-like receptors (TLRs) are highly conserved trans-membrane proteins that play an important role in the detection and recognition of microbial pathogens (Gleeson et al. 2006). Recent studies reported that TLR4, the principal receptor for bacterial LPS, may also be activated by environmental oxidative stress (Boyd et al. 2006). The stimulation of TLRs results in the activation NF κ B pathway which may be an important process in the regulation of the inflammatory mediators during diving (Zbinden-Foncea et al. 2012). We suggest that post scuba diving RONS production in neutrophils could be related with the increased expression of these genes. In fact there are evidences that hydrogen peroxide mediates the increased expression of genes as catalase, HO-1, UCP-3, iNOS and PGC-1 α in HL60 cells (Ferrer et al. 2010). Nitric oxide production contributes to regulation of gene expression of IL-6, IL-8, HO-1 in muscle during exercise (Steensberg et al. 2007). In the same way, it was reported that hyperoxia-induced intracellular ROS production can up-regulate TLR2/4 expression in A549 cells and in lung of mice, leading to the release pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 (Huang et al. 2011; Ogawa et al. 2007). In fact, it has been evidenced that supplementation with different high doses of antioxidants attenuates the systemic increase of IL-6 in response to exercise and the increased expression of PGC-1 α and mitochondrial biogenesis in muscle of trained rats (Bouayed and Bohn 2010; Pedersen and Febbraio 2008; Strobel et al. 2011) evidencing the possible participation of the ROS in the expression of some key genes related with inflammation and mitochondrial biogenesis. Additional studies will be necessary to clarify the participation of RONS in the induction of NF κ B, IL-6 and TLR4 gene expression in neutrophils.

We evidenced an increased expression of TLR4 after diving and recovery suggesting a pro-inflammatory role of circulating neutrophils after scuba diving, probably related with the oxidative stress. The recognition of microbial molecules with conserved molecular structures known as “pathogen associated molecular patterns” (PAMPs) or the detection of endogenous “danger” molecules or “danger associated molecular patterns” (DAMPs) by binding to TLR4 initiate a cellular inflammatory response (Dowling and O'Neill 2012). DAMPs trigger a sterile inflammatory response paramount to tissue and wound repair (Dowling and O'Neill 2012). Eicosanoids are formed from arachidonic acid by the cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxygenase pathways and released rapidly in response to extracellular stimuli. The inducible isoforms of cyclooxygenase (COX-2) and lipoxygenase (5-LOX) play an important role in inflammatory reactions via the production respectively of prostaglandins and leukotrienes. The induction of COX-2 and 5-LOX expression is mediated by the activation of transcriptional factors, especially the NF- κ B (Sud'ina et al. 2008). In accordance with the present results, it was demonstrated that a single bout of exercise accelerates NF- κ B activation as well as COX-2 expression in an intensity-dependent manner human peripheral blood mononuclear cells (Kim et al. 2009). Although COX-2 and 5-LOX increased expression following scuba diving is likely to reflect pro-inflammatory response. However, recent studies have revealed that, during the course of acute inflammation, omega-3 PUFA-derived mediators including resolvins and protectins with potent anti-inflammatory and pro-resolving properties are produced (Seki et al. 2009). The biosynthetic pathway of resolvins is dependent of the aspirin-COX-2 and 5-LOX activities (Serhan et al. 2000), then the increased expression of COX-2 and 5-LOX during the scuba diving recovery also could be related with the pro-resolving inflammation. Additional studies will be necessary to clarify their physiological relevance of neutrophils in response to dive.

The present results evidence a significant increase in the expression of genes encoding for cytokines. However, TNF- α , a classical marker of inflammation induced by infection, did not change in the present results. In general, the cytokine response to exercise and infection differed with regard to TNF- α . Thus, the cytokine response to exercise was not preceded by an increase in plasma TNF- α . The cytokine response evidenced after scuba diving was more similar to the response induced by exercise than the response induced by infection. IL-6 was the first cytokine to increase in as similar

way that occurs after exercise followed by increases in IL-8, IL-10 and IL-1b gene expression. The cytokine cascade induced by exercise markedly differs from the induced by infections occurring with increased circulating levels of well-known anti-inflammatory cytokines and cytokine inhibitors. It was reported that blood cells do not significantly contribute to the IL-6 and other cytokines found in the circulation of healthy subjects; neither at rest nor in response to exercise (Pedersen and Febbraio 2008). However, as the IL-6 expression was highly induced in neutrophils after diving we cannot discard a significant contribution of these cells in increasing the plasma IL-6 levels after exercise. The similarity between the pathway to enhance firstly after scuba diving the expression of IL-6 gene in neutrophils and the fact that the IL-6 is the first cytokine that increased its levels in plasma after acute exercise (Febbraio and Pedersen 2002) suggest that neutrophils contribute to IL-6 appearance in plasma after exercise in addition to the IL-6 contracting muscle production (Febbraio and Pedersen 2002).

Acute exercise is known to induce Hsp72 in a variety of tissues (Skidmore et al. 1995; Walsh et al. 2001) including contracting skeletal muscle (Febbraio et al. 2002; Walsh et al. 2001). However, the increase in serum Hsp72 is produced during exercise and is maintained in post-exercise but it preceded any increase in Hsp72 gene or protein expression in contracting muscle. Skeletal muscle Hsp72 mRNA expression increased 6.5-fold from rest 2 hours postexercise (Walsh et al. 2001). We also detect that 2-hours after scuba diving increase the HSP72 gene expression in neutrophils respect the basal expression suggesting that Hsp72 can be released from neutrophils later, during the recovery period. In addition to its activity as molecular chaperones HSP72 may have another important role in immune defense (Moseley 2000). HSP72 released from cells into the extracellular milieu is able to bind to membranes of other cells stimulate cytokine production in immune cells (Walsh et al. 2001). Moreover, and in accordance with previous studies performed with exercise protocols (Walsh et al. 2001), scuba diving could be able of inducing heat shock proteins, which may in turn activate IL-6 synthesis via HSF1 and HSF2. The increase in HSP72 gene expression could also contribute to the increase in the IL-6 gene expression (Welc et al. 2012).

In conclusion, scuba diving session at high depth which combines hyperbaria and physical activity induces an inflammatory response in neutrophils with increases in cytokine gene expression and genes related with the signaling pathway and synthesis of nitric oxide and lipid mediators. Scuba diving could increase ROS production resulting in increased nitrotyrosine levels and NO production. Additional studies are necessary to

determine the physiological role of neutrophils cytokine and inflammation gene expression.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by the Spanish Ministry of Health and Consumption Affairs (Programme of Promotion of Biomedical Research and Health Sciences, Projects 05/1276, 08/1259, and 11/01791, Red Predimed-RETIC RD06/0045/1004, and CIBERobn CB12/03/30038), Grants of support to research groups no. 35/2011 and 23/2012 (Balearic Islands Gov. and EU FEDER funds).

REFERENCES

- Afanas'ev IB (2007) Signaling functions of free radicals superoxide & nitric oxide under physiological & pathological conditions. *Mol Biotechnol* 37: 2-4
- Bouayed J, Bohn T (2010) Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 3: 228-237
- Boyd JH, Divangahi M, Yahiaoui L, Gvozdic D, Qureshi S, Petrof BJ (2006) Toll-like receptors differentially regulate CC and CXC chemokines in skeletal muscle via NF-kappaB and calcineurin. *Infect Immun* 74: 6829-6838
- Cannon SC, Blumberg JB (2000) Acute phase immune responses in exercise. In: Sen, CK, Packer, L and Hänninen, O, eds *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise* (Elsevier Science BV, Amsterdam): 177-194
- Conger JD, Weil JV (1995) Abnormal vascular function following ischemia-reperfusion injury. *J Investig Med* 43: 431-442
- De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., Shin WS, Liao JK (1995) Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96: 60-68
- Dowling JK, O'Neill LA (2012) Biochemical regulation of the inflammasome. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 47: 424-443
- Febbraio MA, Pedersen BK (2002) Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *Faseb J* 16: 1335-1347
- Febbraio MA, Steensberg A, Fischer CP, Keller C, Hiscock N, Pedersen BK (2002) IL-6 activates HSP72 gene expression in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 1264-1266
- Feldmeier H (2003) Hyperbaric oxygen: indications and results; the hyperbaric oxygen therapy committee report. Undersea and Hyperbaric Medical Society
- Ferrari CK, Souto PC, França EL, Honório-França AC (2011) Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. *Arch Immunol Ther Exp* 59: 441-448
- Ferrer MD, Sureda A, Mestre A, Tur JA, Pons A (2010) The double edge of reactive oxygen species as damaging and signaling molecules in HL60 cell culture. *Cell Physiol Biochem* 25: 241-252

- Francaux M (2009) Toll-like receptor signalling induced by endurance exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* 34: 454-458
- Geering B, Stoeckle C, Conus S, Simon HU (2013) Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol* 34: 398-409
- Glavas D, Markotic A, Valic Z, Kovacic N, Palada I, Martinic R, Breskovic T, Bakovic D, Brubakk AO, Dujic Z (2008) Expression of endothelial selectin ligands on human leukocytes following dive. *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 1181-1188
- Gleeson M, McFarlin B, Flynn M (2006) Exercise and Toll-like receptors. *Exerc Immunol Rev* 12: 34-53
- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Vina J (2008) Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* 44: 126-131
- Huang D, Fang F, Xu F (2011) Hyperoxia-induced up-regulation of Toll-like receptors expression in alveolar epithelial cells. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 23: 645-649
- Jackson MJ, Papa S, Bolanos J, Bruckdorfer R, Carlsen H, Elliott RM, Flier J, Griffiths HR, Heales S, Holst B, Lorusso M, Lund E, Oivind Moskaug J, Moser U, Di Paola M, Polidori MC, Signorile A, Stahl W, Vina-Ribes J, Astley SB (2002) Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Mol Aspects Med* 23: 209-285
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J (2006) Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci* 1067: 425-435
- Kim SY, Jun TW, Lee YS, Na HK, Surh YJ, Song W (2009) Effects of exercise on cyclooxygenase-2 expression and nuclear factor-kappaB DNA binding in human peripheral blood mononuclear cells. *Ann N Y Acad Sci* 1171: 464-471
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11: 519-531
- Moseley PL (2000) Exercise, stress, and the immune conversation. *Exerc Sport Sci Rev* 28: 128-132
- Obad A, Valic Z, Palada I, Brubakk AO, Modun D, Dujic Z (2007) Antioxidant pretreatment and reduced arterial endothelial dysfunction after diving. *Aviat Space Environ Med* 78: 1114-1120

- Ogawa Y, Tasaka S, Yamada W, Saito F, Hasegawa N, Miyasho T, Ishizaka A (2007) Role of Toll-like receptor 4 in hyperoxia-induced lung inflammation in mice. *Inflamm Res* 56: 334-338
- Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, Akita H, Yokoyama M (1997) Nitric oxide inhibits neutrophil adhesion to cytokine-activated cardiac myocytes. *Am J Physiol* 272: H2807-2814
- Pedersen BK, Akerstrom TC, Nielsen AR, Fischer CP (2007) Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol* 103: 1093-1098
- Pedersen BK, Febbraio MA (2008) Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev* 88: 1379-1406
- Pedersen BK, Febbraio MA (2012) Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol* 8: 457-465
- Seki H, Tani Y, Arita M (2009) Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 89: 126-130
- Sen CK, Packer L (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* 10: 709-720
- Serhan CN, Takano T, Chiang N, Gronert K, Clish CB (2000) Formation of endogenous "antiinflammatory" lipid mediators by transcellular biosynthesis. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins inhibit neutrophil recruitment and vascular permeability. *Am J Respir Crit Care Med* 161: S95-S101
- Shek PN, Shephard RJ (1998) Physical exercise as a human model of limited inflammatory response. *Can J Physiol Pharmacol* 76: 589-597
- Skidmore R, Gutierrez JA, Guerriero V, Jr., Kregel KC (1995) HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. *Am J Physiol* 268: R92-97
- Steensberg A, Keller C, Hillig T, Frosig C, Wojtaszewski JF, Pedersen BK, Pilegaard H, Sander M (2007) Nitric oxide production is a proximal signaling event controlling exercise-induced mRNA expression in human skeletal muscle. *Faseb J* 21: 2683-2694
- Strobel NA, Peake JM, Matsumoto A, Marsh SA, Coombes JS, Wadley GD (2011) Antioxidant supplementation reduces skeletal muscle mitochondrial biogenesis. *Med Sci Sports Exerc* 43: 1017-1024
- Sud'ina GF, Pushkareva MA, Shephard P, Klein T (2008) Cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) selectivity of COX inhibitors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 78: 99-108

- Sureda A, Ferrer MD, Mestre A, Tur JA, Pons A (2013) Prevention of neutrophil protein oxidation with vitamins C and e diet supplementation without affecting the adaptive response to exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 23: 31-39
- Tibbles PM, Edelsberg JS (1996) Hyperbaric-oxygen therapy. *N Engl J Med* 334: 1642-1648
- Tsatsanis C, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN (2006) Signalling networks regulating cyclooxygenase-2. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1654-1661
- Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Nakamura M, Jordan JE, Ronson RS, Thourani VH, Guyton RA (1999) Nitric oxide and the vascular endothelium in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci* 874: 354-370
- Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A, Simon P (2011) Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 17: 6-63
- Walsh RC, Koukoulas I, Garnham A, Moseley PL, Hargreaves M, Febbraio MA (2001) Exercise increases serum Hsp72 in humans. *Cell Stress Chaperones* 6: 386-393
- Welc SS, Phillips NA, Oca-Cossio J, Wallet SM, Chen DL, Clanton TL (2012) Hyperthermia increases interleukin-6 in mouse skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 303: C455-466
- Zbinden-Foncea H, Raymackers JM, Deldicque L, Renard P, Francaux M (2012) TLR2 and TLR4 activate p38 MAPK and JNK during endurance exercise in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 44: 1463-1472

Table 1. Primers and conditions used in real-time PCRs

Gene	Primers	Conditions
18S	Fw: 5'-ATG TGA AGT CAC TGT GCC AG-3'	95°C 10 s
	Rv: 5'-GTG TAA TCC GTC TCC ACA GA-3'	60°C 10 s
		72°C 12 s
NFkB	Fw: 5' - AAACACTGTGAGGATGGGATCTG-3'	95°C 10 s
	Rv: 5' - CGAAGCCGACCACCATGT-3'	60°C 10 s
		72°C 15 s
TNFa	Fw: 5'-CCCAGGCAGTCAGATCATCTTCTCGGAA -3'	95°C 10 s
	Rv: 5'-CTGGTTATCTCTCAGCTCCACGCCATT -3'	63°C 10 s
		72°C 15 s
IL-8	Fw: 5' - GCTCTGTGTGAAGGTGCAGTTTTGCCAA-3'	94°C 10 s
	Rv: 5'-GGCGCAGTGTGGTCCACTCTCAAT-3'	63°C 10 s
		72°C 15 s
MPO	Fw: 5' - TGAACATGGGGAGTGTTTCA-3'	95°C 5 s
	Rv: 5' - CCAGCTCTGCTAACCAGGAC-3'	60°C 7 s
		72°C 10 s
COX-2	Fw: 5'-TTGCCTGGCAGGGTTGCTGGTGGTA-3'	95°C 10 s
	Rv: 5'-CATCTGCCTGCTCTGGTCAATGGAA-3'	63°C 10 s
		72°C 15 s
IL-6	Fw: 5'-TACATCCTCGACGGCATCTC -3'	95°C 10 s
	Rv: 5'-ACTCATCTGCACAGCTCTGG -3'	63°C 10 s
		72°C 12 s
IL-10	Fw: 5'-AGAACCTGAAGACCCTCAGGC -3'	95°C 10 s
	Rv: 5'-CCACGGCCTTGCTCTTGTT -3'	58°C 10 s
		72°C 15 s
IL-1B	Fw: 5'-GGACAGGATATGGAGCAACA -3'	95°C 10 s
	Rv: 5'-GGCAGACTCAAATTCAGCT -3'	58°C 10 s
		72°C 15 s
HSP-72	Fw: 5'-CCGGCAAGGCCAACAAGATC -3'	94°C 10 s
	Rv: 5'-CCTCCACGGCGCTCTTCATG-3'	59°C 10 s
		72°C 15 s
TLR-2	Fw: 5'-GGGTTGGAAGCACTGGACAAT-3'	95°C 10s
	Rv: 5'-TTCTTCCTTGAGAGGCTGA-3'	55°C 40s
		72°C 15 s
TLR-4	Fw: 5'-GGTCACCTTTTCTTGATTCCA-3'	95°C 10 s
	Rv: 5' - TCAGAGGTCCATCAAACATCAC-3'	55°C 10 s
		72°C 15 s
INOs	Fw: 5'-TCTGCAGACACGTGCGTTACT-3'	95°C 15 s
	Rv: 5'-ATGCACAGCTGAGCATTCCA-3'	62°C 15 s
		72°C 20 s
5-LOX	Fw: 5'-GGGCATGGAGAGCAAAGAAG-3'	95°C 10 s
	Rv: 5'-ACCTCGGCCGTGAACGT-3'	59°C 10 s
		72°C 15 s

Table 2. Effects of scuba diving session on neutrophil counts and markers of nitric oxide production, oxidative and nitrosative damage

	Pre-dive	Post-dive	Recovery
Neutrophils	3.27 \pm 0.29	3.58 \pm 0.32	5.29 \pm 0.49 *
Nitrite (uM/mg)	68.9 \pm 9.4	92.2 \pm 11.2	118 \pm 15 *
iNOS (%)	100 \pm 13	92.5 \pm 18.1	108 \pm 16
Ntyr (%)	100 \pm 15	182 \pm 27 [#]	254 \pm 31 *
MDA (uM/mg)	2.37 \pm 0.18	2.34 \pm 0.30	2.45 \pm 0.16

Statistical analysis: One-way ANOVA. (#) significant respect pre-dive. (*) significant differences respect pre-dive and post-dive, $p < 0.05$

Table 3. Effects of a diving session at high deep on neutrophil expression expression of genes related with the signaling pathway and synthesis of nitric oxide and lipid mediators

	Pre-dive	Post-dive	Recovery
NF-κB	100 \pm 14	151 \pm 11 [#]	192 \pm 19 *
Toll-like 2	100 \pm 12	101 \pm 7	117 \pm 18
Toll-like 4	100 \pm 15	182 \pm 27 [#]	254 \pm 31 *
COX-2	100 \pm 16	160 \pm 34	361 \pm 32 *
5-LOX	100 \pm 16	88.0 \pm 6.4	198 \pm 26 *
iNOS	100 \pm 9	105 \pm 10	147 \pm 14 *

Statistical analysis: One-way ANOVA. (#) significant respect pre-dive. (*) significant differences respect pre-dive and post-dive, $p < 0.05$

Table 4. Effects of a diving session at high deep on expression of genes related with the neutrophil cytokine synthesis and inflammation

	Pre-dive	Post-dive	Recovery
TNFα	100 \pm 11	89.2 \pm 12	131 \pm 17
IL-6	100 \pm 19	188 \pm 12 [#]	346 \pm 27 *
IL-8	100 \pm 18	137 \pm 18	285 \pm 32 *
IL-10	100 \pm 17	118 \pm 14	230 \pm 30 *
IL-1b	100 \pm 20	129 \pm 19	200 \pm 24 *
HSP72	100 \pm 17	83.1 \pm 8.0	187 \pm 17 *
MPO	100 \pm 21	82.9 \pm 8.5	102 \pm 20

Statistical analysis: One-way ANOVA. (#) significant respect pre-dive. (*) significant differences respect pre-dive and post-dive, $p < 0.05$

Manuscrito VII

**HYPERBARIC OXYGEN THERAPY IN THE MANAGEMENT OF CHRONIC
WOUND INDUCES AN ANTIOXIDANT RESPONSE AND MODULATES
PLASMA VEGF AND ENDOTHELIN-1**

Manuscripto VII**HYPERBARIC OXYGEN THERAPY IN THE MANAGEMENT OF CHRONIC WOUND INDUCES AN ANTIOXIDANT RESPONSE AND MODULATES PLASMA VEGF AND ENDOTHELIN-1****ABSTRACT**

Hyperbaric oxygen (HBO) treatment is the medical use of oxygen at higher than 1 atmosphere of pressure. The aim of the study was to evaluate the effects of HBO clinical treatment on the antioxidant response and the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with chronic wounds. Ten patients with a chronic wounded situation (diabetic wounds, osteomyelitis, enteritis radica and osteoarthritis) were volunteered to participate in the study. The average time wounds without healing before starting the HBO treatment were 20.5 ± 10.1 months. The patients performed 20 HBO sessions and blood samples were taken before and 2 hours after the sessions 1, 5 and 20. No significant differences were reported in the hematological parameters. Serum CK activity was progressively decreasing with the sessions performed. No significant differences were reported in any enzymatic activity of erythrocytes after HBO treatments. Plasma catalase activity responded to the HBO therapy with a significant increase after the first and fifth sessions. Plasma MPO activity was significantly reduced after all analysed sessions. VEGF levels significantly increased after the sessions respect to the pre-session values. Endothelin-1 levels were progressively decreasing during the HBO therapy, with significant differences at the session 20. No significant differences were evidenced in plasma nitrite levels. The levels of MDA adducts in plasma were significantly lower at the last analysed session. In conclusion, HBO therapy increases the plasma antioxidant defenses and regulates angiogenesis and vascular tone by increasing VEGF and decreasing endothelin-1, which may be important factors in promoting enhanced wound healing.

Keywords: hyperbaria, hyperoxia, oxidative stress, chronic wounds, antioxidants

INTRODUCTION

Hyperbaric oxygen treatment (HBO) is the medical use of the oxygen at pressures higher than 1 atmosphere, usually at 2–3 ATA with 100% of oxygen. The therapeutic principle behind HBO stems from increasing the partial pressure of the oxygen into the body tissues (Tibble, Edelsberg 1996). In addition, HBO increases the oxygen-carrying capacity of blood plasma beyond those achievable under normobaric conditions. HBO therapy has been effectively used to manage many clinical diseases (Buras 2000; Thackham et al. 2008). In fact, there are currently 13 indications for which the Undersea and Hyperbaric Medical Society (UHMS) recommends the treatment with HBO. Wound related indications include chronic diabetic wounds, delayed radiation injury (osteoradionecrosis), necrotizing soft tissue infections, enhancement of healing in selected problem wounds, thermal burns, compromised skin grafts and flaps, crush injury, clostridal myositis, myonecrosis (gas gangrene), and refractory osteomyelitis. Non-wound related indications include decompression sickness, air/gas embolism, carbon monoxide poisoning, exceptional blood loss anemia, and intracranial abscess. In these pathological situations, the most common factors resulting in the development of a chronic wound are thought to be related to the detrimental effects of prolonged oxygen deficiency (Tandara, Mustoe 2004). Related to this observation, HBO has been demonstrated to reduce the rate of major lower limb amputations among diabetics (Game et al. 2012). Hyperoxia during HBO is also an important mediating factor for wound collagen deposition and cross-linking and neovascularization (Boykin, Baylis 2007).

The primary rationale behind the use of HBO in the treatment of chronic wounds is to raise the amount of oxygen delivered to the wound site. HBO cannot significantly increase the amount of oxygen bound to hemoglobin molecules but can increase the amount of oxygen dissolved in the plasma (Sheffield 1998). It was reported that the stimulation of angiogenesis is one of the most important features of HBO in the treatment of chronic wounds (Muhonen et al. 2004; Sheikh et al. 2005). Other important effects of HBO related to wound recovery are an increased collagen synthesis, improved bacterial killing, antibiotic potentiating, suppression of bacterial propagation, down-regulation of inflammatory signals, and prevention of leukocyte activation and adhesion following ischemic reperfusion (Kendall et al. 2012).

Exposure to HBO may increase formation of reactive oxygen species (ROS), which is in direct proportion to the increased oxygen tension. An overly produced ROS is detrimental because it significantly damages cell structures such as lipids, proteins and nucleic acids resulting in relevant alteration of health status (Wells et al. 2009). On the other hand, slightly increased ROS may be beneficial because ROS may also act as secondary messengers in the intracellular signal transduction as well as in a variety of cell processes in different biological systems (Krawiec et al. 2000; Thom 2009). In this way, vascular endothelial growth factor (VEGF) has been shown to be up-regulated by both hypoxic and hyperoxic conditions, whereas endothelin-1 appears to be decreased after a depth dive being associated to the hyperoxia phenomenon (Gole et al. 2011). VEGF is considered one of the most important promoters of angiogenesis which is essential for the maintenance of functional and structural integrity of blood vessels and, endothelin-1 contributes to the maintenance of the basal vascular tone and blood pressure through activation of vascular smooth muscle.

The aim of the present study was to investigate the molecular basis that participates in the beneficial effects of HBO therapy in chronic wounded patients. Concretely, antioxidant enzyme activities were determined in plasma and erythrocytes as well as in plasma myeloperoxidase activity and malondialdehyde adducts. Plasma levels of VEGF and endothelin-1 were also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Subjects characteristics

Ten patients, seven men and three women, (67.4 ± 6.0 years old) that presented a chronic wounded situation were volunteered selected to take part in the present study. Five of the patients suffered from diabetic wounds, three of them from osteomyelitis, two from enteritis radica and another one from osteoarthritis. The average time wounds without symptoms of healing were 20.5 ± 10.1 months at the time of starting the HBO treatment. The subjects were non-smokers and did not take any antioxidant dietary supplement for 1 month before the study. Prior to the sessions, all patients passed a rutinary physical and medical test in the hospital.

Experimental procedure

The treatment consisted of dry HBO exposures in a hyperbaric chamber for a period longer than one month. Subjects were exposed to 100% oxygen at a pressure of 2.2 ATA in a hyperbaric chamber during 60 min.

Blood samples were collected before and 2 hours after the first, the fifth and the twentieth HBO treatments. Venous blood samples were obtained from the antecubital vein of patients in suitable vacutainers. Hematological parameters such as erythrocyte and leukocyte number and hematocrit and hemoglobin concentration were determined in an automatic flow cytometer analyzer Technicon H2 (Bayer) VCS system. Creatine kinase was determined in serum by standard procedures using an autoanalyser (Technicon DAX System; Parera et al., 1996). The protocol was in accordance with the Declaration of Helsinki for research on human subjects and was approved by the Ethical Committee of Clinical Investigation of the CAIB (Palma de Mallorca, Balearic Islands, Spain). All the subjects were informed of the purpose and demands of the study before giving their written consent to participate.

Erythrocyte and plasma purifications

Blood samples were centrifuged at 900g at 4°C for 30 min. The plasma was recovered, and the erythrocyte phase at the bottom was washed with PBS and centrifuged as above. Erythrocytes were reconstituted and hemolyzed with distilled water in the same volume as plasma. Plasma and erythrocytes were immediately stored at -80°C until use. All biochemical assays were performed in duplicate.

Antioxidant enzyme activities

Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were determined in plasma and erythrocytes, glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) activities were determined in erythrocytes and myeloperoxidase (MPO) activity was determined in plasma. CAT activity was measured by a spectrophotometric method on the basis of the decomposition of H₂O₂ (Aebi 1984). GR activity was measured by a modification of the Goldberg and Spooner (1984) spectrophotometric method. This assay required oxidized glutathione as the substrate. GPx activity was measured using an adaptation of the spectrophotometric method of Flohé and Gunzler (1984). This assay required H₂O₂ and NADPH as substrates and GR as enzyme indicator. SOD activity was measured by an adaptation of the method of McCord and Fridovich (1969). The xanthine/xanthine

oxidase system was used to generate the superoxide anion. This anion produced the reduction of cytochrome C, which was monitored at 550 nm. MPO activity was measured by guaiacol oxidation (Capeillere-Blandin 1998). The reaction mixture contained sodium phosphate buffer (pH 7) and 13.5 mM guaiacol. The reaction was initiated by adding 300 μ M H₂O₂, and changes at 470 nm were monitored. All activities were determined with a Shimadzu UV-2100 spectrophotometer at 37°C.

MDA protein adducts

Plasma MDA protein adducts were determined by an enzyme immunoassay (Cell Biolabs, Inc.). Briefly, standards or protein samples (10 μ g·mL⁻¹) were adsorbed onto a 96-well plate and incubated overnight at 4°C. MDA–protein adducts were probed with an anti-MDA antibody, followed by an HRP-conjugated secondary antibody. Quantification was performed by comparing unknown samples with a standard curve of known concentration.

Immunoassay for VEGF AND endothelin-1

Determination of plasma VEGF and endothelin-1 concentration was performed using commercially available immunoassay kits (Assay Designs, Inc., Ann Arbor, MI) following the manufacturer's instructions. Assays were performed in duplicate, and optical density was determined using a microplate reader set to 450 nm.

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using Statistical Package for Social Sciences (SPSS v.17.0 for Windows). Results are expressed as mean \pm SEM and $P < 0.05$ was considered statistically significant. A Kolmogorov–Smirnov test was applied to assess the normal distribution of the data. The statistical significance of the data was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA).

RESULTS

Representative images of the evolution of a diabetic wound are reported in figure 1. The images show the wound in the foot before the first HBO session (A) and the same foot after 20 HBO sessions (B).

Hematological parameters and CK are reported in Table 1. No significant differences were reported in any on the hematological parameters analyses. Serum CK activity was decreasing with the sessions performed. The values obtained at the session 5 were significant lower than the values from the first session, and the values from the session 20 were also lower than the values obtained in the sessions 1 and 5.

Erythrocyte and plasma antioxidant enzyme activities are presented in Table 2, respectively. No significant differences were reported in any enzymatic activity of erythrocytes after HBO treatments. Plasma antioxidant reported no significant differences in SOD activity. Catalase activity responded to the HBO therapy with a significant increase after the first and fifth sessions ($p<0.05$) and this increase was not significant after 20 HBO sessions. Plasma MPO activity was significantly reduced after all the HBO analyzed sessions.

Plasma VEGF and endothelin-1 levels are shown in Table 3. VEGF levels significantly increased after all the sessions analyzed respect to the pre-session values ($p<0.05$), but without different between the session 1, 5 and 20. Endothelin-1 levels were progressively decreasing during the HBO therapy, although the differences were only statistically significant at the session 20 respect to the initial values obtained in the first session ($p<0.05$). No significant differences were evidenced in plasma nitrite levels.

Plasma MDA adducts are reported in figure 2. The levels of MDA adducts in plasma were significantly lower at the last analyzed session when compared with the initial values ($p<0.05$).

DISCUSSION

The present results evidence that hyperbaric oxygen therapy is a useful tool in the management of chronic and necrotizing wounds. These findings support the potential benefit of HBO in a number of clinical applications. The subjects participating in the study had infections and/or arterial or venous insufficiency with long-standing wounds lasting for several months without having experienced any improvement. HBO treatment has been shown to cause significant decreases in wound size and rapid healing rates in accordance with previous studies (Kendall et al. 2012; Kessler et al. 2003; Zamboni et al. 1997). A systematic review about interventions to enhance the healing of chronic ulcers of the foot in diabetes indicates that HBO reduces the rate of major

amputation in people who have chronic foot ulcers complicating diabetes and, in general, resulted in a significant benefit in terms of healing (Game et al. 2012).

No significant differences were reported in hematological parameters and erythrocyte antioxidant enzymes in the present work. In accordance, multiple HBO therapy in patients with chronic wounds was reported not to cause disturbances to haematological parameters (Handy et al. 2005). A previous study performed with male divers that breathed 100% O₂ in a hyperbaric chamber for two hours at 1, 1.5 and 2 atmospheres also reported that does not appear to be a strong dose-dependent oxidative stress response in erythrocytes (Gasier, Fothergill 2013).

In a previous study with healthy subjects, we evidenced that HBO session did not induce changes in plasma and lymphocyte markers of oxidative damage, although there was an antioxidant response evidenced with an increase in lymphocyte GPX activity and HO-1 gene expression (Ferrer et al. 2007). In the present study, plasma creatine kinase activity and plasma MDA adducts decreased with the treatment being significantly lower at session 20. The decrease in both markers of oxidative damage is in accordance with the recovery process evidenced in the patients. In fact, it was evidenced that patients with first myocardial infarction receiving thrombolytic therapy alone showed a higher peak of creatine kinase activity compared with the HBO group (Dekleva et al. 2004). Moreover, several studies reported minor changes in markers of lipid peroxidation in plasma after HBO exposures (Gasier, Fothergill 2013; Gurdol et al. 2008).

The therapeutic principle behind HBO is the increase in the partial pressure of oxygen in the tissues of the body. The HBO could increase the ROS production and consequently induce a protective response to help cells and tissues to manage various environmental and endogenous stressors more efficiently. The increase in ROS production after HBO activates the nuclear factor $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$) which may play a role in the initiation of the protective mechanisms (Vince et al. 2011). In accordance, HBO therapy increased plasma catalase activity increasing its antioxidant capability. Several authors reported increased in the total antioxidant capacity measured in plasma after treatment with HBO (Goudable et al. 1996; Labrousche et al. 1999; Sureda et al. 2009). Moreover, it was reported that HBO can act as a hormetic agent that activates antioxidant and cytoprotective genes to later protect against a lethal insult (Godman et al. 2010). MPO activity decreased in plasma after each HBO session throughout the treatment procedure. The decrease in the plasma MPO could be indicative of a

decreased neutrophil activation. Exposure to hyperbaric oxygen at 3 ATA for 45 mm inhibits leukocyte adherence mediated by B₂ integrins, protecting tissues from injury (Chen et al. 1996). In this way, repetitive sessions of HBO could adapt the oxidative machinery of neutrophils in order to decrease the sensitivity against the stimuli, reducing the inflammatory response and facilitating the recovery of the damaged tissues.

VEGF is considered one of the most important angiogenic factors that has a powerful growth-stimulatory effect on endothelial cells, and is also a potent mediator of vascular permeability (Gordillo et al. 2008). HBO therapy induces moderate ROS production, which can enhance VEGF release and thus to promote angiogenesis (Luo, Chen 2005). During wound healing, ROS may act as signaling mediators that regulate the production of VEGF and a variety of cellular responses. HBO stimulates VEGF expression for angiogenesis improving the recovery process. A previous study in human umbilical vein endothelial cells reported significant increase in the expression of VEGF after treatment with hyperbaric oxygen (Lee et al. 2006). However, there are only few studies performed in humans analyzing the effects of HBO on VEGF levels and the results obtained are controversial (Jung et al. 2010; Wang et al. 2011), probably as a consequence of different experimental and HBO treatment and the different type of wounds studied. Nitric oxide released from smooth muscle cells has been suggested to be involved in the signaling cascade that results in VEGF production (Zachary, Glicki 2001). In patients whose wounds were favorably affected by HBO therapy, increased levels of nitric oxide were observed in response to HBO treatment (Boykin, Baylis 2007). However, in the present study, although the nitrite levels tend to increase 2 hours after each HBO session, no significant differences were evidenced. It could be suggested that NO levels peaked early after the HBO session and the nitrite levels were normalized after 2 hours.

Endothelin-1 is the major vasoconstrictor endothelium-derived factor playing a role in the regulation of basal vascular tone (Alonso, Radomski 2003). Endothelin-1 presented significant lower values after 20 sessions of HBO respect to the initial values. This response could be important in order to maintain the adequate vascular tone during diving and after HBO and to increase the vascular blood flow facilitating the oxygen availability to wounded tissues. NO has been reported to effectively suppress release and physiological action of endothelin-1 and can also nitrosylate endothelin receptors reducing their affinity for endothelin-1 (Bescos et al. 2012; de Beer et al. 2011). Thus,

in addition to its direct vasodilator effects, NO indirectly induces vasodilation by limiting the release of endothelin-1 (Lundberg et al. 2008).

In conclusion, HBO is a useful tool to treat chronic wounds associated with pathological conditions compromising blood supply and tissue oxygenation. The present results indicate that HBO treatment regulates the plasma antioxidant response, and angiogenesis and vascular tone by increasing VEGF and decreasing endothelin-1, which in turn may enhance chronic wound healing. However, more strong evidences are necessary to a better understanding of the molecular and beneficial effects of HBO therapy in the management of chronic wounds.

ACKNOWLEDGMENTS

The study was supported by the Spanish Ministry of Health and Consumption Affairs (Programme of Promotion of Biomedical Research and Health Sciences, Projects 05/1276, 08/1259, and 11/01791, Red Predimed-RETIC RD06/0045/1004, and CIBERobn CB12/03/30038), Grants of support to research groups no. 35/2011 and 23/2012 (Balearic Islands Gov. and EU FEDER funds).

REFERENCES

- Aebi HE (1984) Catalase. *Methods in Enzymatic Analysis*:pp 273-286.
- Alonso D, Radomski MW (2003) Nitric oxide, platelet function, myocardial infarction and reperfusion therapies. *Heart Fail Rev* 8:47-54
- Bescos R, Ferrer-Roca V, Galilea P, et al. (2012) Sodium nitrate supplementation does not enhance performance of endurance athletes. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 4:2400–2409
- Boykin JV, Jr., Baylis C (2007) Hyperbaric oxygen therapy mediates increased nitric oxide production associated with wound healing: a preliminary study. *Adv Skin Wound Care* 20:382-8
- Buras J (2000) Basic mechanisms of hyperbaric oxygen in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Int Anesthesiol Clin* 38:91-109
- Capeillere-Blandin C (1998) Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. *Biochem. J.* 336:395-404.
- Chen Q, Banick PD, Thom SR (1996) Functional inhibition of rat polymorphonuclear leukocyte B2 integrins by hyperbaric oxygen is associated with impaired cGMP synthesis. *J Pharmacol Exp Ther* 276:929-33
- de Beer VJ, Bender SB, Taverne YJ, et al. (2011) Exercise limits the production of endothelin in the coronary vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300:1950-1959
- Dekleva M, Neskovic A, Vlahovic A, et al. (2004) Adjunctive effect of hyperbaric oxygen treatment after thrombolysis on left ventricular function in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 148:E14
- Ferrer MD, Sureda A, Batle JM, et al. (2007) Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. *Free Rad. Res.* 41:274-81
- Flohe L, Gunzler WA (1984) Assays for glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105:114-21.
- Game FL, Hinchliffe RJ, Apelqvist J, et al. (2012) A systematic review of interventions to enhance the healing of chronic ulcers of the foot in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 28 Suppl 1:119-41
- Gasier HG, Fothergill DM (2013) Oxidative stress, antioxidant defenses and nitric oxide production following hyperoxic exposures. *Undersea Hyperb Med* 40:125-34
- Godman CA, Joshi R, Giardina C, et al. (2010) Hyperbaric oxygen treatment induces antioxidant gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1197:178-83

- Goldberg DM, Spooner RJ (1984) Glutathione reductase. In: Bergmeyer, H.U., ed, *Methods in Enzymatic Analysis* (Verlag Chemie, Basel), pp 258-265. *Methods in Enzymatic Analysis*:00 258-265.
- Gole Y, Gargne O, Coulange M, et al. (2011) Hyperoxia-induced alterations in cardiovascular function and autonomic control during return to normoxic breathing. *Eur. J. Appl. Physiol.* 111:937-946
- Gordillo GM, Roy S, Khanna S, et al. (2008) Topical oxygen therapy induces vascular endothelial growth factor expression and improves closure of clinically presented chronic wounds. *Clin Exp Pharm Physiol* 35:957–964
- Goudable J, Delafosse B, Viale JP (1996) Acute effects of hyperbaric hyperoxic exposures on lipid peroxidation and total oxidant capacity. *Clin Nutr* 15:10
- Gurdol F, Cimsit M, Oner-Iyidogan Y, et al. (2008) Early and late effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress parameters in diabetic patients. *Physiol Res* 57:41-7
- Handy RD, Bryson P, Moody AJ, et al. (2005) Oxidative metabolism in platelets, platelet aggregation, and hematology in patients undergoing multiple hyperbaric oxygen exposures. *Undersea Hyperb Med* 32:327-40
- Jung S, Wermker K, Poetschik H, et al. (2010) The impact of hyperbaric oxygen therapy on serological values of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). *Head Face Med* 6:29
- Kendall AC, Whatmore JL, Harries LW, et al. (2012) Changes in inflammatory gene expression induced by hyperbaric oxygen treatment in human endothelial cells under chronic wound conditions. *Exp Cell Res* 318:207-16
- Kessler L, Bilbault P, Ortega F, et al. (2003) Hyperbaric oxygenation accelerates the healing rate of nonischemic chronic diabetic foot ulcers: a prospective randomized study. *Diabetes Care* 26:2378-82
- Krawiec Z, Bilinski T, Schuller C, et al. (2000) Reactive oxygen species as second messengers? Induction of the expression of yeast catalase T gene by heat and hyperosmotic stress does not require oxygen. *Acta Biochim. Pol.* 47:201-7
- Labrousse S, Javorschi S, Leroy D, et al. (1999) Influence of hyperbaric oxygen on leukocyte functions and haemostasis in normal volunteer divers. *Thromb. Res.* 96:309-15

- Lee CC, Chen SC, Tsai SC, et al. (2006) Hyperbaric oxygen induces VEGF expression through ERK, JNK and c-Jun/AP-1 activation in human umbilical vein endothelial cells. *J Biomed Sci* 13:143-56
- Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT (2008) The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 7:156-167
- Luo JD, Chen AF (2005) Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol* 26:259–264
- McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-55.
- Muhonen A, Haaparanta M, Gronroos T, et al. (2004) Osteoblastic activity and neoangiogenesis in distracted bone of irradiated rabbit mandible with or without hyperbaric oxygen treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33:173-8
- Sheffield PJ (1998) Measuring tissue oxygen tension: a review. *Undersea Hyperb Med* 25:179-88
- Sheikh AY, Rollins MD, Hopf HW, et al. (2005) Hyperoxia improves microvascular perfusion in a murine wound model. *Wound Repair Regen* 13:303-8
- Sureda A, Ferrer MD, Batle JM, et al. (2009) Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 41:1271-1276
- Tandara AA, Mustoe TA (2004) Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World J Surg* 28:294-300
- Thackham JA, McElwain DL, Long RJ (2008) The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review. *Wound Repair Regen* 16:321-30
- Thom SR (2009) Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J. Appl. Physiol.* 106:988 –995
- Tibble PM, Edelsberg JS (1996) Hyperbaric-oxygen therapy. *N. Engl. J. Med.* 334:1642–1648
- Vince RV, Midgley AW, Laden G, et al. (2011) The effect of hyperbaric oxygen preconditioning on heat shock protein 72 expression following in vitro stress in human monocytes. *Cell Stress Chaperones* 16:339-43
- Wang CJ, Ko JY, Kuo YR, et al. (2011) Molecular changes in diabetic foot ulcers. *Diabetes Res Clin Pract* 94:105-10

Wells PG, McCallum GP, Chen CS, et al. (2009) Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci* 108:4-18

Zachary I, Gliki G (2001) Signaling transduction mechanism mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. . *Cardiovasc. Res.* 49:568–581

Zamboni WA, Wong HP, Stephenson LL, et al. (1997) Evaluation of hyperbaric oxygen for diabetic wounds: a prospective study. *Undersea Hyperb Med* 24:175-9

Table 1. Hematological parameters and creatine kinase activity

	Session 1		Session 5		Session 20	
	Before	After	Before	After	Before	After
Erythrocytes (10⁶·μL⁻¹)	4.19 ± 0.08	4.22 ± 0.09	4.10 ± 0.08	4.15 ± 0.07	4.11 ± 0.09	4.17 ± 0.12
Hematocrit (%)	38.7 ± 0.6	38.7 ± 0.7	38.6 ± 0.6	38.6 ± 0.6	38.2 ± 0.7	38.8 ± 0.9
Hemoglobin (g·dL⁻¹)	12.9 ± 0.9	12.9 ± 1.0	12.5 ± 1.0	12.7 ± 0.9	12.6 ± 1.1	12.6 ± 1.4
Leukocytes (10³· μL⁻¹)	5.85 ± 0.17	6.23 ± 0.20	6.32 ± 0.18	6.37 ± 0.20	6.75 ± 0.26	6.58 ± 0.32
CK (U/L)	249 ± 31	226 ± 27	175 ± 16 [#]	171 ± 15 [#]	125 ± 9.4 ^{\$}	123 ± 9.3 ^{\$}

Hematological parameters and CK activity in samples obtained from wounded patients (n=10) before and after the sessions 1, 5 and 20 of the HBO treatment. One way ANOVA, P < 0.05, # indicates significant differences respect to session 1. \$ indicates significant differences respect to sessions 1 and 5.

Table 2. Erythrocyte and plasma enzyme activities

	Session 1		Session 5		Session 20	
	Before	After	Before	After	Before	After
Erythrocytes						
CAT (k/10 ⁹ cells)	9.17 ± 0.81	9.87 ± 0.55	11.2 ± 1.6	13.3 ± 1.3	12.3 ± 1.2	12.2 ± 1.8
GPx (nkat/10 ⁹ cells)	19.8 ± 0.4	20.9 ± 0.5	20.4 ± 0.5	19.7 ± 0.7	19.7 ± 0.6	20.2 ± 0.6
GR (nkat/10 ⁹ cells)	1.43 ± 0.08	1.49 ± 0.07	1.43 ± 0.10	1.42 ± 0.11	1.34 ± 0.08	1.38 ± 0.06
SOD (pkat/10 ⁹ cells)	1.98 ± 0.04	2.03 ± 0.07	2.03 ± 0.04	1.99 ± 0.05	1.93 ± 0.06	1.94 ± 0.05
Plasma						
CAT (kat·L ⁻¹)	70.3 ± 10.3	173 ± 39*	72.9 ± 8.4	133 ± 34*	73.5 ± 12.6	84.1 ± 7.8
SOD (pkat·L ⁻¹)	207 ± 35	222 ± 30	192 ± 21	202 ± 15	166 ± 20	171 ± 22
MPO (nKat·L ⁻¹)	10.2 ± 0.9	6.12 ± 0.53*	10.6 ± 1.1	6.35 ± 0.32*	9.37 ± 0.74	7.25 ± 0.91*

Erythrocyte and plasma enzyme activities obtained from wounded patients (n=10)

before and after the sessions 1, 5 and 20 of the HBO treatment. One way ANOVA, P <

0.05, * indicates significant differences between samples obtained before HBO

treatment and after HBO treatment.

Table 3. VEGF and endothelin-1 levels

	Session 1		Session 5		Session 20	
	Before	After	Before	After	Before	After
Nitrite ($\mu\text{mol/L}^{-1}$)	5.31 \pm 0.65	5.96 \pm 0.82	5.29 \pm 0.81	5.87 \pm 0.86	5.32 \pm 0.66	5.71 \pm 0.94
VEGF ($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	15.9 \pm 3.5	58.8 \pm 8.2 *	26.1 \pm 7.4	66.8 \pm 7.3 *	36.1 \pm 7.5	47.9 \pm 9.8 *
Endothelin-1 ($\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	4.94 \pm 0.17	4.75 \pm 0.42	5.13 \pm 0.56	4.77 \pm 0.29	3.51 \pm 0.21 #	3.81 \pm 0.41 #

VEGF and endothelin-1 results in plasma obtained from wounded patients (n=10) before and after the sessions 1, 5 and 20 of the HBO treatment. One way ANOVA, $P < 0.05$, * indicates significant differences between samples obtained before HBO treatment and after HBO treatment, # indicates significant differences respect to the session 1.



Figure 1. HBO is an effective treatment for chronic diabetic wounds. A representative example of a wound in a foot is shown before the initiation of HBO treatment (A), and after HBO treatment (B).

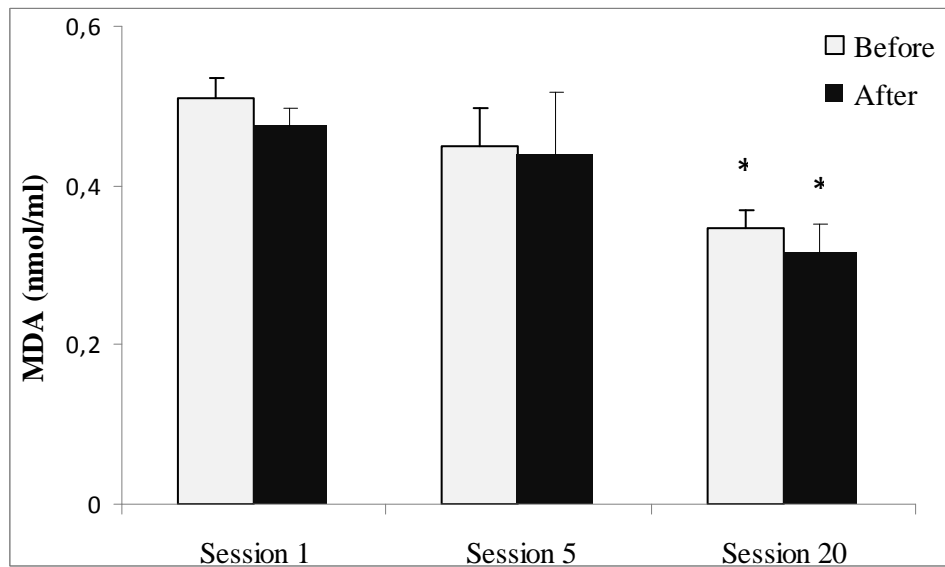


Figure 2. MDA adducts in plasma obtained from wounded patients (n=10) before and after the sessions 1, 5 and 20 of the HBO treatment. One way ANOVA, $P < 0.05$, * indicates significant differences between the session 20 and the session 1.

Manuscrito VIII

**PREVENCIÓN DE EMBOLISMO ARTERIAL GASEOSO EN BUCEADORES
EN APNEA. ESTUDIO DE 50 CASOS DE ACCIDENTES DESCOMPRESIVOS
EN APNEA**

Manuscrito VIII**PREVENCIÓN DE EMBOLISMO ARTERIAL GASEOSO EN BUCEADORES EN APNEA. ESTUDIO DE 50 CASOS DE ACCIDENTES DESCOMPRESIVOS EN APNEA****RESUMEN**

Los accidentes descompresivos son un fenómeno que se produce no solo durante la práctica de deportes subacuáticos con escafandra, sino también a causa de la pesca submarina en apnea. El número de casos en las Islas Baleares se ha registrado desde la creación del Institut de Recerca Hiperbàrica MEDISUB en el año 1994, observándose un incremento progresivo de los mismos, debido básicamente al mayor número de practicantes federados. Se dispone del perfil del buceo de los pescadores en apnea que han padecido accidentes descompresivos obtenidos mediante profundímetros digitales. Se han evaluado las inmersiones realizadas por buceadores en apnea que han sufrido accidentes y otras que no. Se han valorado en estos perfiles de buceo en apnea los tiempos de inmersión, la profundidad alcanzada y los tiempos en superficie. A partir de los datos obtenidos se han elaborado unas tablas Breath-hold Apnea Tables for Lower Embolism (BATLE[®]) en las que se recogen los tiempos mínimos que deben permanecer los deportistas en superficie entre inmersiones para evitar los accidentes disbáricos; estos tiempos entre inmersiones están relacionados con la profundidad y el tiempo de permanencia en apnea de las inmersiones precedentes. La valoración del número de accidentes descompresivos tras la aplicación de las tablas BATLE[®] refuerzan su aplicabilidad en la reducción significativa del riesgo de padecer accidentes descompresivos en buceadores en apnea. En conclusión, las mencionadas tablas se presentan como una buena herramienta para evitar los accidentes por descompresión.

Palabras clave: buceadores en apnea, accidente descompresivo, oxigenoterapia, tablas BATLE[®].

1.- INTRODUCCIÓN

En las costas del mar Balear la temperatura del agua es constante casi todo el año y sus aguas presentan una pureza y transparencia considerable, de manera que los deportistas de pesca submarina gozan de la posibilidad de entrenarse prácticamente todo el año. De hecho, las Islas Baleares cuentan con el honor de ser la cuna de gran número de campeones mundiales de pesca submarina. Todo ello ha contribuido a que este deporte esté en gran auge y que exista un gran número de adeptos a la pesca submarina. La presión a la que se somete a las presas hace que cada vez la pesca sea más escasa y que las grandes piezas estén a mayor profundidad, lo que va unido a una mayor velocidad de descenso y ascenso para poder estar más tiempo en el fondo. Esta situación recuerda el aforismo *celerius, profundius, periculosius* (1), y que llevaba a los buceadores en apnea a utilizar sistemas de propulsión electromecánica (*scooters* submarinos, aunque actualmente prohibidos) para conseguir alcanzar profundidades de hasta 63 metros.

La media de pescadores submarinos federados en relación con los 1,1 millones de habitantes de todas las Islas Baleares es de 1 pescador federado por cada 737 habitantes, aunque como puede observarse, es en Mallorca donde existe un mayor número de practicantes (Tabla 1).

Número de practicantes federados de pesca submarina					
	Nº de practicantes				Practicantes/ Nº de habitantes 2010
	1995	2000	2005	2010	
Mallorca	1234	1205	1363	1489	1 / 607
Menorca	35	37	41	54	1 / 1727
Ibiza	6	8	11	15	1 / 12273
Baleares	1275	1250	1415	1558	1 / 737

Tabla 1. Número de practicantes federados de pesca submarina contabilizados en los años 1995, 2000, 2005 y 2010 en las Islas Baleares y su relación con el número de habitantes totales.

Además, debe tenerse en cuenta que mucha gente práctica este deporte sin la correspondiente licencia federativa. El equipo que utilizan estos pescadores es muy completo, incluye el vehículo todoterreno con remolque, para poder desplazarse y transportar la embarcación a cualquier punto de la isla, incluso a lugares de difícil

acceso; la embarcación autotransportable que suele ser neumática o de fibra de vidrio de entre 5 y 7 metros de eslora y completamente equipada (sonda, GPS, radio y teléfono celular, depósitos de gran autonomía, que permiten desplazarse de una isla a otra) (2).

El perfil anatómico del buceador de las Islas Baleares es varón de constitución atlética de 173 cm de altura y de 73 Kg de peso con una tensión arterial de 122 / 75 mm Hg y 63 pulsaciones por minuto con tendencia a la bradicardia (3).

Los accidentes descompresivos en apnea (Tabla 2) a diferencia de los de escafandra eran totalmente desconocidos, por lo que no fueron estudiados en detalle. Sin embargo, se sabe que en las Islas Baleares, se produjeron 3 accidentes descompresivos en apnea durante el año 1988 y otro accidente más en 1989. En 1992 fue publicado el primer caso de accidente de descompresión en buceador practicante de apnea durante el transcurso de un campeonato Mundial de Pesca Submarina en aguas de Menorca (4).

Año	Mallorca	Menorca	Ibiza	Año	Mallorca	Menorca	Ibiza
1988	2	1	0	2000	2	0	0
1989	1	0	0	2001	3	0	0
1992	0	1	0	2002	2	0	0
1993	0	0	0	2003	2	1	0
1994	2	0	0	2004	2	0	0
1995	4	0	0	2005	1	0	0
1996	6	1	3	2006	0	0	0
1997	8	0	5	2007	1	0	0
1998	4	1	2	2008	2	0	0
1999	4	1	2	2009	0	0	0
2000	2	0	0	2010	1	0	0
2001	3	0	0	2011	0	0	0
2002	2	0	0	2012	1	1	0
2003	2	1	0	2013	1	1	1
				Total	44	6	12

Tabla 2. Distribución del número de accidentes de descompresión acontecidos de enfermedad descompresiva en buceadores de apnea desde los años 1988 hasta la actualidad. En rojo se indica los casos evaluados y en seguimiento por MEDISUB.

Puesto que se desconocía la patología, inicialmente se creyó que la causa era el sobreesfuerzo asociado a la actividad física, pero posteriormente se demostró la

existencia de daño cerebral, claramente atribuible a la frecuencia de las inmersiones realizadas y a las inmersiones profundas y repetidas frecuentemente (4). En 1994 se produjeron dos casos más, sin embargo fue a partir de 1995 cuando realmente, debido al uso de los *scooters* submarinos, se produjo una gran casuística de casos que llamó la atención (4).

2.- EVIDENCIA CLÍNICA

Los tiempos y el perfil de la inmersión típica de un buceador en apnea son de 30 s para descender a unos 30 m ($v = 1\text{m/s}$), 50 s de estancia en el fondo y 30 s de ascenso aproximadamente, seguido de 2 minutos de preparación en superficie para la siguiente bajada; el número de apneas por hora es de entre 12 y 15 y en cada entrenamiento suelen repetir el proceso por un periodo de entre unas tres y hasta nueve horas. Con estas tácticas son capaces de mantenerse a estas profundidades la mitad del tiempo que dura la apnea (Figura 1).

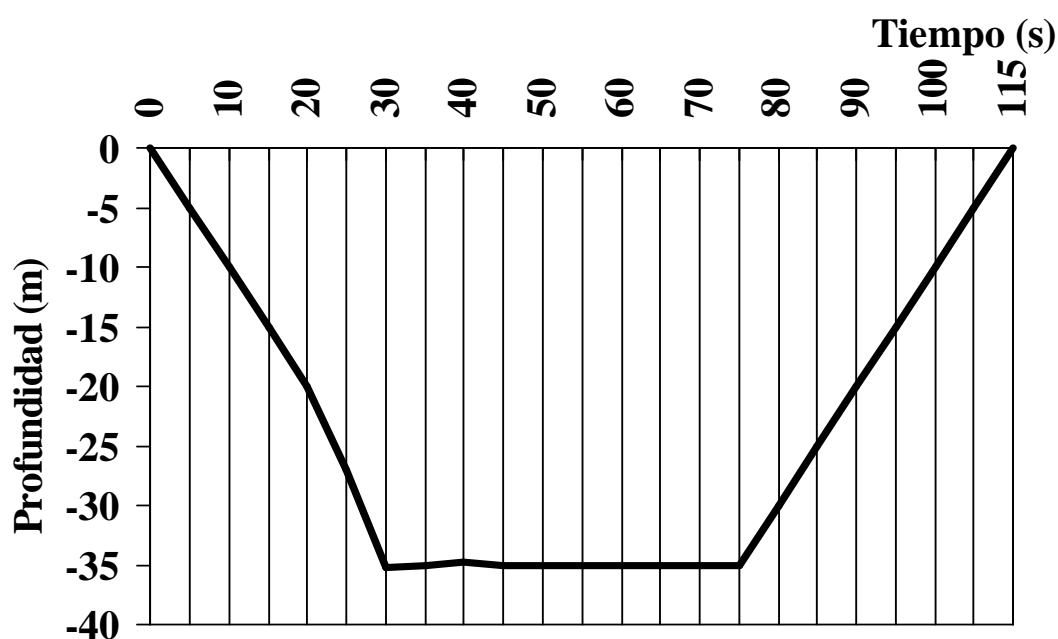


Figura 1. Representación gráfica del perfil de una inmersión simple típica en buceadores en apnea que se repiten a lo largo de 80 o 100 inmersiones por jornada de entrenamiento.

Inicialmente, la causa de los accidentes asociados a la apnea se atribuyó a que el ascenso era muy rápido, por lo que tras las primeras reuniones, los consejos fueron que la velocidad de ascenso fuera más lenta. Sin embargo, los accidentes descompresivos en apnea continuaron produciéndose, por lo que claramente se evidenció que la causa del accidente no era la velocidad del ascenso a superficie. La causa siguiente a la que se atribuyó el accidente, al igual que los buceadores con escafandra autónoma, fue la realización de varias inmersiones con un intervalo en superficie inferior a 10 minutos. Si el intervalo en superficie es inferior a 10 minutos se considera como una inmersión continuada dado que no hay tiempo suficiente para la desaturación. En consecuencia deben sumarse los tiempos permanencia en el fondo, y tomarse la cota de más profundidad para hacer el cálculo descompresivo. A pesar de ello, las tablas de descompresión de buceo con escafandra de la *US Navy* no son aplicables al buceo en apnea. De hecho, el cálculo del coeficiente de saturación de nitrógeno que se realiza con las tablas *US Navy* da por resultado que el coeficiente de nitrógeno residual no varía cuando los buceadores están diez minutos o más en superficie; es decir, es el mismo al principio y al final del intervalo en superficie. El tiempo de estancia en superficie no es valorable con las tablas *US Navy* por lo que la posible desaturación es insuficiente. Adicionalmente, la profundidad que alcanzan los buceadores en apnea en sucesiva inmersiones es muy variable lo que hace muy difícil el cálculo aplicando las tablas *US Navy*. Por otra parte, el tiempo de permanencia en superficie entre inmersiones de los buceadores en apnea es muy variable. En una 1 hora de buceo en apnea pueden producirse un promedio de 10 inmersiones con un total medio aproximado de estancia en el fondo de 20 minutos. En principio, siguiendo este perfil, por cada minuto que el buceador está en el fondo, permanecerá posteriormente dos minutos en superficie. Sin embargo, en la práctica este criterio no se cumple, ya que suelen permanecer dos minutos en el fondo y dos en superficie (Figura 2); lo que sí sucede es que durante la sesión de pesca pueden llegar a estar unos 10 minutos encima de la embarcación al cambiar de zona. Cada sesión supone más de tres horas, por lo que al sumarlas, el tiempo total por sesión es de 50 a 60 minutos de tiempo total en el fondo. Teniendo en cuenta esto, que las cotas de profundidad son de 35-40 metros y aplicando los protocolos de cálculo descompresivo de la *US Navy* (6-10) se puede comprobar que

algunos de estos buceadores sobrepasan la llamada “curva de seguridad”. Esto implica que el buceador debería realizar paradas de descompresión por un periodo de casi el doble del tiempo que han permanecido en el fondo, ya que al ser buceo en apnea no cabe la posibilidad de realizar paradas de descompresión. Algunos tejidos llegan a estados de sobresaturación de nitrógeno alcanzando el factor crítico al final de la inmersión y produciéndose un fenómeno de polimicroembolismo gaseoso multifocal responsable de los síntomas de la enfermedad descompresiva (11-14).

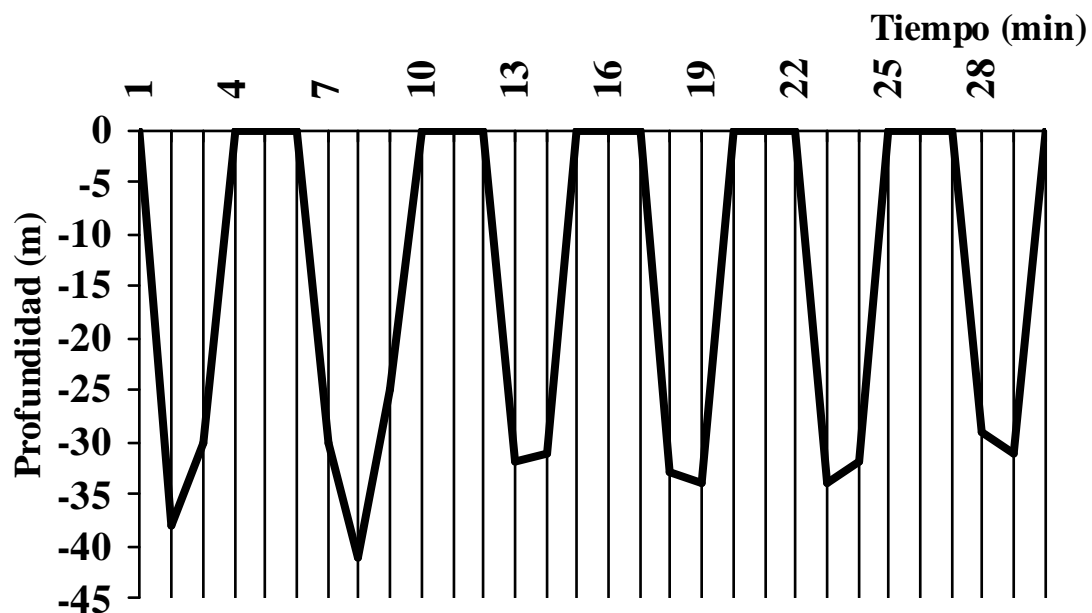


Figura 2. Representación gráfica del perfil de las inmersiones sucesivas realizadas durante 30 minutos. Este ritmo puede mantenerse de entre 3 a 9 horas a lo largo de una sesión de buceo.

Cabe destacar que se han producido casos de enfermedad descompresiva en los que la profundidad de inmersión no ha superado los 20 metros (Figura 3). El problema posiblemente deriva del hecho que el tiempo en el fondo fue de 120 segundos con menos de 30 segundos de intervalo en superficie y a lo largo de unas 2 horas.

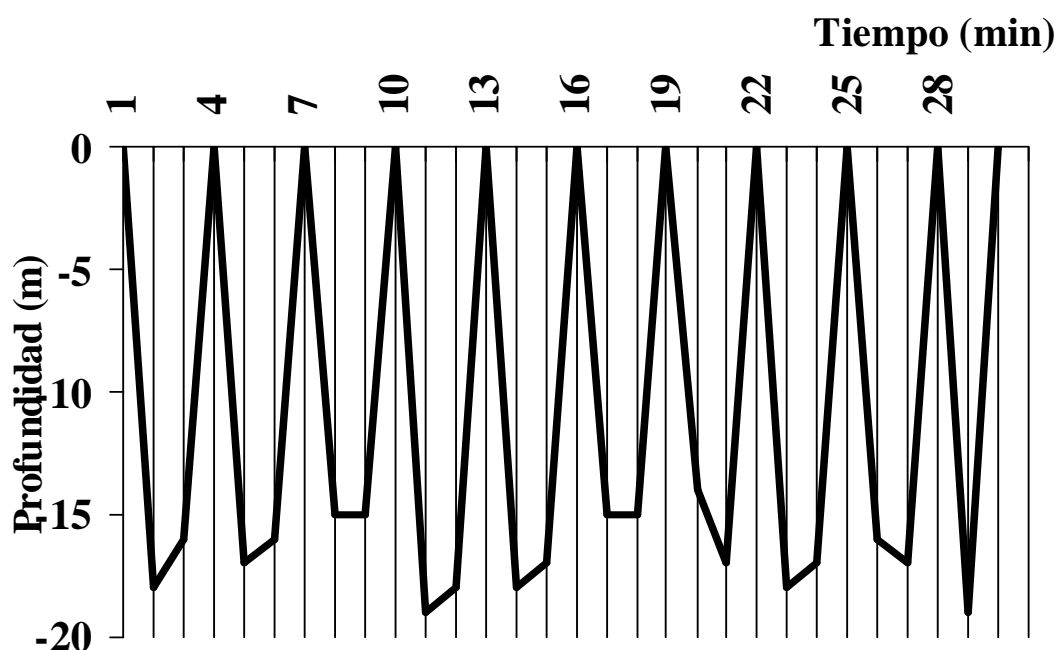


Figura 3. Representación gráfica del perfil de las inmersiones sucesivas realizadas durante 30 minutos a menos de 20 metros de profundidad que puede mantenerse durante 2 o más horas de duración de la sesión que también presentó la sintomatología de embolismo arterial gaseoso.

Por tanto, una vez descartados algunos posibles mecanismos etiológicos, la evidencia nos demuestra que hay un paso de gases a los tejidos. El mecanismo por el que los gases pasan a la sangre, en un buceador en apnea, es difícil de demostrar ya que se supone que los gases inspirados en superficie están a 1 atmósfera de presión (15). Una de las formas por las cuales pudiera actuar es que al haber una gran presión ambiente y al ser el tórax un recipiente semirrígido, el volumen del gas contenido en el sistema respiratorio se reduce de acuerdo a la Ley de Boyle (en una experiencia realizada en un buceador experimentado con una Capacidad Pulmonar Vital (CPV) de 9,6 litros a 133 metros de profundidad se midió su CPV y era de tan sólo 0,67 litros (16)). Como resultado se eleva el diafragma arrastrando parte de la masa abdominal hacia la cavidad torácica, o por un mecanismo inverso, la presión exterior comprime la cavidad abdominal y ésta pasa a ocupar el volumen del aire comprimido de los pulmones. De esta forma, aunque el buceador no respire aire comprimido desde una escafandra autónoma, la presión que

le rodea del medio ambiente acuático hace que su organismo tenga aire comprimido en su interior.

Hay que tener en cuenta que en el caso de los buceadores de apnea, la presión intratorácica será positiva hasta que el tórax disminuya su volumen al máximo, a partir de entonces se convertirá en un espacio aéreo rígido, no comprimible por lo que si se sigue descendiendo y, por ello se va aumentando la presión ambiental, la presión intratorácica pasa a ser negativa, inferior a la del entorno. Desde el momento en que la presión es negativa, el aparato respiratorio va a ejercer una función inversa, al ser mayor la presión arterio-venosa que la presión intraalveolar se puede producir una extravasación de líquido del sistema vascular pulmonar al espacio alveolar (*Chest Squeeze*) (17). Si esta situación se prolonga durante mucho tiempo puede acabar en un edema pulmonar (18), que incluso puede llegar a ser irreversible provocando la muerte. Pensando en la posibilidad de que la sintomatología fuese debida a la saturación de nitrógeno y que provocase un accidente descompresivo, se opta por seguir las recomendaciones del Dr. R.W. Hamilton (19) del Hamilton Research Clinical Hyperbaric Technologies, Inc. (Nueva York), el cual propuso la utilización para el buceo en apnea de ordenadores convencionales de buceo para escafandra autónoma. Aunque estos ordenadores presentaban algoritmos no adecuados para el buceo en apnea, sí que podían ser orientativos para los objetivos de prevención de los accidentes disbáricos en apneistas, al permitir un cálculo aproximado de la saturación de nitrógeno. Una vez puesto en práctica, pudo evidenciarse que las indicaciones del buceo en escafandra aplicadas al buceo en apnea para inmersiones sucesivas durante periodos de tiempo largo no son de aplicación. Así, los buceadores de apnea ya se encontrarían en un nivel de saturación 100%, con la consiguiente necesidad de hacer paradas de descompresión, en el supuesto caso de que hubiesen realizado el mismo ejercicio en escafandra. Tras dos horas de práctica de actividades subacuáticas en apnea con unas 8 inmersiones continuadas a una profundidad de unos 20-25 metros en menos de 10 minutos, con una profundidad máxima alcanzada de unos 25-30 metros (Figura 4), el nivel de saturación del nitrógeno tisular sería alrededor del 100% si hacemos el cálculo simulando el buceo en escafandra.

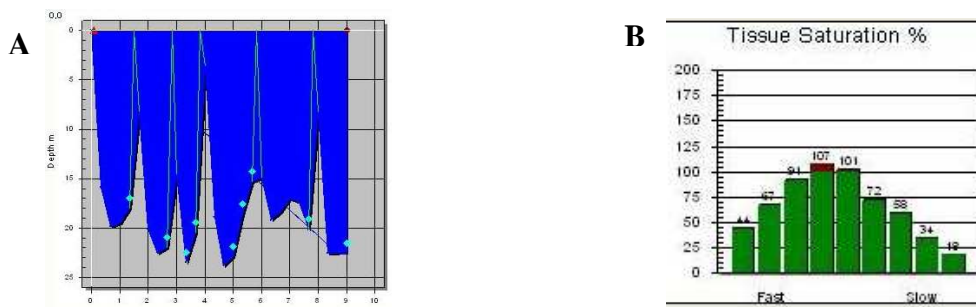


Figura 4. Representación gráfica del perfil de las inmersiones sucesivas realizadas durante 2 horas y en la figura se ven los últimos 10 minutos a aproximadamente 25 metros de profundidad (A) y la representación del porcentaje de saturación de los tejidos (B) tras una sesión de 2 horas de entrenamiento.

En el caso de que el buceador que ha realizado el ejercicio de más de dos horas en apnea continúe su sesión de entrenamiento durante una hora más, se puede observar que el perfil de las inmersiones disminuye en profundidad y que la saturación de los tejidos es mayor. Tras 3 horas de buceo en apnea a profundidades de unos 20-25 metros, la saturación de algunos tejidos alcanza el 128%, momento en el que el buceador de apnea sufre un accidente y empieza a apreciar algunos de los síntomas, y le obliga a suspender la sesión de entrenamiento (Figura 5).

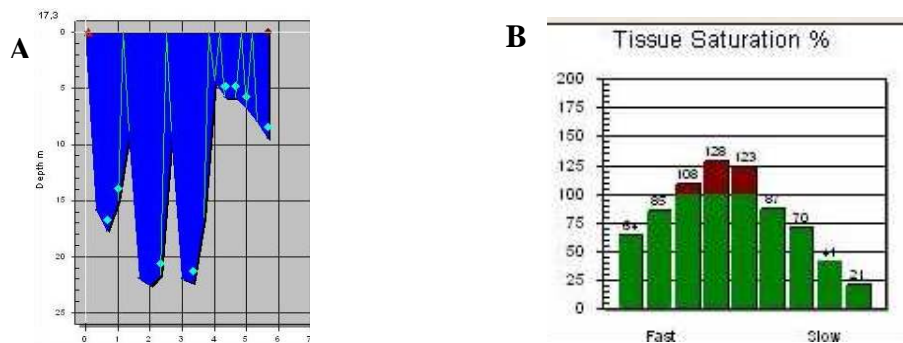


Figura 5. Representación gráfica del perfil de las inmersiones sucesivas realizadas durante 7 minutos a aproximadamente 20-25 metros de profundidad (A) y la representación del porcentaje de saturación de los tejidos (B) tras una sesión de 3 horas de entrenamiento.

En accidentes de buceo con escafandra autónoma, que sólo han realizado una inmersión, los síntomas suelen aparecer entre los 10 minutos y las 12 horas tras haber finalizado la

inmersión; es lo que se conoce como “periodo de latencia”. En los buceadores de apnea la aparición de los síntomas es inmediata, incluso en algunos, la aparición de síntomas es lo que les ha hecho abandonar su actividad. Es difícil conocer, cronometrar o controlar el periodo de latencia ya que al ser muchas las inmersiones continuadas con sus bajadas y ascensos, es prácticamente imposible saber cuál es la que provoca la formación de burbujas. Puede ser en el ascenso de la inmersión realizada 10 minutos antes de manera que la sintomatología aparezca al cabo de 10 minutos, o bien ser la última inmersión la causante de dicho disbarismo y ser la responsable de la aparición de la sintomatología de forma inmediata. Cabe destacar que en algunos casos el buceador refiere que ya desde varias inmersiones anteriores o la anterior a presentar la enfermedad descompresiva se nota algo anormal. Los síntomas se caracterizan por los signos típicos de un accidente disbárico con accidente cerebro-vascular, cansancio intenso que se acompaña de síntomas y signos neurológicos que hacen sospechar la afectación del sistema nervioso central (12-14). En lo que hace referencia a los síntomas aparecidos en los primeros 35 casos estudiados se detecta la presencia de sintomatología diversa: 14 casos con parestesias en hemicuerpo, 14 con pérdida visual en hemicampos, 14 con disartria, afasia y dislalia, 8 casos con alteraciones visuales, 8 casos con alteraciones psíquicas, 7 de hemiplejia, 6 de cefalalgia, 6 de vértigo, 3 con convulsiones, 4 con marcha atáxica, 1 con síndrome extrapiramidal, 1 con alteraciones cardiológicas y 1 caso con hiperacusia (ver Tabla 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
HEMIPARESIA	X	X			X						X	X				X	X		X	X			X		X	X			X		X				
HEMIANOPSIA				X				X	X		X		X	X	X		X	X			X	X				X				X		X			
AFASIA DISLALIA		X		X				X	X	X	X		X						X	X			X	X	X		X					X			
ALT. VISUALES		X					X			X				X	X					X									X	X					
ALT. PSIQUICAS	X	X			X			X	X					X				X		X									X	X					
HEMIPLEJIA			X			X						X		X								X		X	X		X								
CAFALEA										X			X	X				X											X		X				
VERTIGO												X		X		X							X					X		X					X
CONVULSIONES	X							X	X					X																					
MARCHA ATAXICA						X	X																										X	X	
SINDR. EXTRAPIRAMIDAL	X																																		
ALT. CARDIOLOGICAS									X																										
HIPERACUSIA																							X												
TREATMENTO OHB	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X		X		X		X
EDAD	31	29	26	22	23	42	27	33	32	24	28	33	31	26	24	32	32	25	29	35	26	26	40	24	34	31	33	36	32	30	30	26	37	32	21
PROFUNDIDAD	38	31	43	40	38	30	34	35	32	42	33	42	38	37	40	41	46	42	42	40	30	25	27	25	40	34	33	25	30	32	30	25	37	30	27
TIEMPO INMERSION	120	120	120	120	90	90	120	150	120	90	150	100	120	120	150	180	100	150	120	90	90	120	90	100	120	90	90	90	90	120	100	120	120	90	
INTERV. SUPERF.	5	5	3	6	6	30"	2	1	1	2	6	4	2	4	5	3	4	7	6	5	6	6	1	1	2	1	1	3	6	5	2	3	4	3	3
HORAS X SESION	4	3	3,5	3	1	2	2	5	2	5	1,5	4,5	4	4	2,5	2	5,5	9	5	3	7	4	2	2	3	6	1,5	3	3	2	3	6	3,5	4	5

Tabla 3. Tabla con los primeros 35 casos estudiados con la sintomatología, tipo de tratamiento, edad, profundidad, tiempo medio de las inmersiones, tiempo medio de intervalo en superficie, y número de horas de entrenamiento o competición.

En todos los casos estudiados la tipología del accidente es el de enfermedad descompresiva con afectación neurológica (12-15) (Figuras 6 y 7). No se describe ningún caso de dolores osteo-musculares (BENDS) ni manchas en la piel. Se realizó una placa de tórax y una analítica sanguínea general en la que cabe destacar un aumento considerable de las CPK, como marcadores de daño muscular.

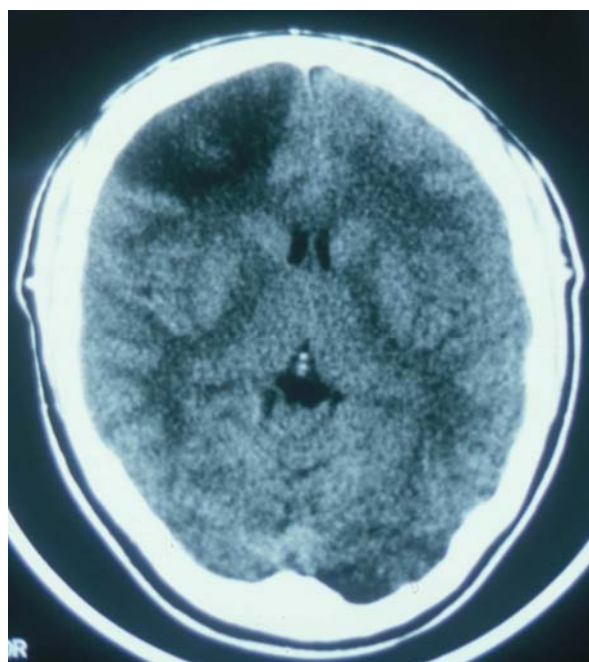


Figura 6. TAC craneal en pescador submarino después de una jornada que duró 9 horas con inmersiones a unos 40 metros.

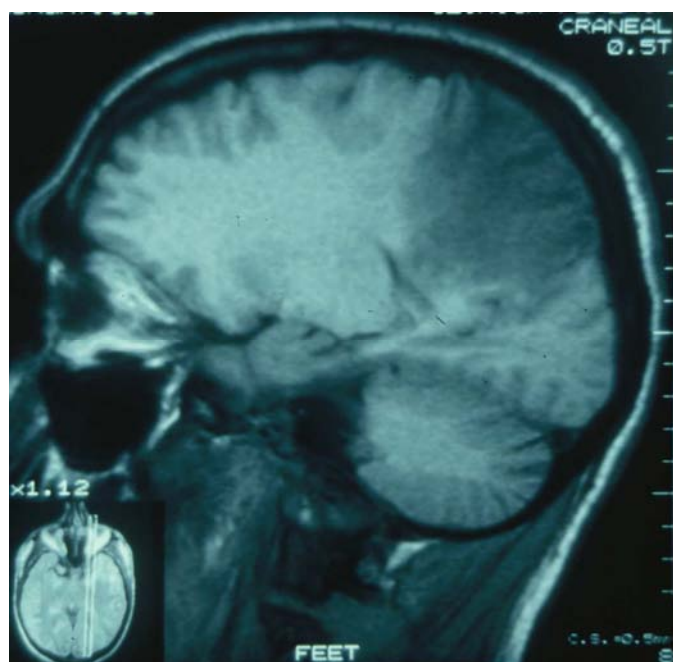


Figura 7. Resonancia magnética craneal en pescador submarino después de una jornada que duró unas 3 horas con inmersiones a unos 35 metros.

Aunque no es frecuente poder visualizar imágenes de embolia gaseosa en las primeras 48 horas, la realización de un TAC craneal previo al tratamiento de Oxigenoterapia Hiperbárica (OHB) permite observar lesiones incipientes. Dada la gravedad del embolismo y, de forma extraordinaria, ya se observan imágenes borrosas de las lesiones que se evidencian más nítidamente después de 48 h de evolución en ciertos casos. A los dos días del tratamiento hiperbárico la mayoría de los casos se resuelven, aunque en un 10% se ve el efecto masa de la zona lesionada y la desviación en el tejido cerebral. En los casos tratados en Ibiza la realización de una resonancia magnética permite desde el primer momento evidenciar imágenes indudables de embolias gaseosas con infartos

isquémicos de diferente localización. Cabe destacar que en los casos descritos, la mayoría de las zonas isquémicas suelen ser en los lóbulos frontales o en los lóbulos occipitales, lo que puede ser debido a la postura de la cabeza durante el ascenso: si el buceador está mirando hacia la superficie posiblemente la burbuja tomará una dirección hacia el lóbulo frontal, y si por el contrario el buceador en el momento del ascenso está mirando hacia abajo, mirando la pieza que ha capturado o el fondo, posiblemente la burbuja tomará una dirección hacia el lóbulo occipital dando por consiguiente una alteración en la visión.

El tipo de tratamiento seguido en todos los casos es el que se describe a continuación. A los pacientes durante su traslado con ambulancia se les proporciona oxigenación normobárica (ONB) al 100% y a la llegada del hospital, según el estado, se continua con ONB (20,21). En 4 casos fue suficiente la ONB para su recuperación, en cambio en los otros pacientes fue necesario el tratamiento con OHB siendo utilizadas las tablas CX 12, USN 5, y USN 6 modificada (21). Todos los pacientes tratados con OHB se recuperaron por completo. Los pacientes que no parecían revestir mayor gravedad, y que no acudieron hasta algunos días más tarde a la consulta, fueron tratados con ONB y precisaron de un periodo de convalecencia muy superior a los que fueron tratados con OHB.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Sistemas de tratamiento en cámara hiperbárica y registro de accidentes en apnea

El "Institut de Recerca Hiperbárica MEDISUB" se fundó en Mallorca en 1994 (5), pero no fue hasta 1995 cuando se empezó a documentar de forma exhaustiva todos los casos ocurridos en Mallorca y algunos casos de Menorca. MEDISUB instauró un sistema de vigilancia de accidentes de buceo que supuso detectar todos los accidentes de buceo que han acontecido desde 1995.

En Mallorca durante el periodo de 1994 a 1997, para el tratamiento en cámara Hiperbárica se utilizó una cámara HAUX 1300 con capacidad para 4 buceadores sentados o 2 tumbados en el compartimento principal y para dos buceadores en la antecámara. Posteriormente, desde 1998 y hasta la actualidad se utiliza una cámara

TEDSA 1800 con capacidad para 7 buceadores sentados o 2 tumbados en el compartimento principal, y para dos buceadores en la antecámara.

En Menorca durante el periodo de 1985 a 2008, para el tratamiento en cámara Hiperbárica se utilizó una cámara 1300 con capacidad para 4 buceadores sentados o 1 tumbado en el compartimento principal y para un buceador en la antecámara. Posteriormente, desde 2009 y hasta la actualidad se utiliza una cámara HAUX 1300 con capacidad para 4 buceadores sentados o 2 tumbados en el compartimento principal y para dos buceadores en la antecámara.

En Ibiza, desde 1998 para el tratamiento en cámara Hiperbárica se usa una cámara TEDSA 1300 con capacidad para 4 buceadores sentados o 2 tumbados en el compartimento principal y para un buceador en la antecámara.

3.2. Perfiles de inmersión y parámetros de la inmersión: base de datos de la casuística de las inmersiones

Desde que se empezó el estudio en 1997 participaron sujetos sin ninguna problemática que realizaron sus sesiones de entrenamiento monitorizadas mediante anotaciones del número de inmersiones realizadas, de la duración de la inmersión y del tiempo de estancia subacuática ya sea de forma manual o mediante profundímetros digitales (SUUNTO). Mediante estos profundímetros quedan grabadas los perfiles de las inmersiones. Aunque estos profundímetros digitales durante los años de estudio todavía estaban en fase de prueba en Europa, se pudieron utilizar de forma satisfactoria.

Los datos recogidos de los buceadores accidentados y de los colaboradores se introdujeron en una base de datos, se calcularon los coeficientes. Uno fue el cociente entre el tiempo total (segundos) de inmersión dividido por el tiempo total (segundos) en superficie de la sesión de buceo. Otro coeficiente es el tiempo total de recuperación en superficie dividido por el tiempo total (segundos) de inmersión de la sesión de buceo. El tercer coeficiente (coeficiente de saturación) a tener en cuenta fue el resultado del tiempo (segundos) de una inmersión única multiplicado por la presión absoluta media (atmósferas) (Figura 8).

$$\text{Coeficiente a} = \frac{\text{Tiempo total de inmersión (s)}}{\text{Tiempo total recuperación superficie (s)}}$$

$$\text{Coeficiente b} = \frac{\text{Tiempo total recuperación superficie (s)}}{\text{Tiempo total de inmersión (s)}}$$

$$\text{Coeficiente de saturación} = \text{Tiempo inmersión única (s)} \times \frac{(\text{Profundidad} / 10) + 2 P_{\text{atm}}}{2}$$

Figura 8. Fórmulas para la obtención de los coeficientes (coeficiente a, coeficiente b y coeficiente de saturación) estudiados en buceadores con accidente disbárico y buceadores control.

Estos coeficientes obtenidos de los buceadores accidentados y de los buceadores no accidentados se compararon entre ellos. El cálculo del coeficiente de saturación tiene en cuenta la profundidad media de cada inmersión, el tiempo de cada inmersión y la totalidad del tiempo de inmersión de la sesión de entrenamiento y la de buceo con riesgo de accidente, dicho valor resultante ha servido para diferenciar la línea que transcurre entre un buceador de riesgo de accidente y un buceador conservador. Finalmente, obteniendo la presión absoluta media de cada inmersión multiplicado por el tiempo de inmersión en segundos se determinó el tiempo de intervalo en superficie en segundos que debe permanecer el buceador para eliminar todo el gas acumulado durante su tiempo de estancia bajo el agua. Los resultados se han tabulado y han dado lugar a la tabla llamada "**B**reath-hold **A**pnea **T**able for **L**ower **E**mbolism" (BATLE[®]).

4.- RESULTADOS

Durante los años 1997 y 1998, se realizó un estudio comparativo entre las inmersiones de los mismos atletas sin que presentasen sintomatología. La principal diferencia evidente entre atletas accidentados y no accidentados fue en el intervalo en superficie siendo significativamente mayor en los deportistas no accidentados. Sin embargo, asimismo hubo algún que otro accidente, incluso estando 6 minutos en superficie. En consecuencia se envió el aviso a todos los buceadores que habían colaborado en el

estudio de que se debía mediar entre una bajada y la siguiente un intervalo en superficie de 7-8 minutos. Sin embargo, no se sabía a que era debido este periodo necesario, por lo que era preciso buscar una fórmula o una cifra en relación al tiempo de inmersión y la profundidad alcanzada.

La fórmula utilizada para elaborar la primera tabla de Prevención de Accidentes es la que se muestra en la figura 9.

$$\frac{(\text{Profundidad}/10) + 1}{2} \times \text{tiempo de inmersión}$$

Figura 9. Fórmula utilizada para generar las tablas Breath-hold Apnea Table for Lower Embolism (BATLE[®]) de primera generación.

Indicar que los cálculos realizados en el presente estudio se han llevado a cabo con buceadores superentrenados, por lo que en buceadores con una formación básica o con poca experiencia puede ser necesario un intervalo superior al indicado en la tabla.

depth/time	1'	1' 10"	1' 20"	1' 30"	1' 40"	1' 50"	2'	2' 10"	2' 20"	2' 30"	2' 40"	2' 50"	3'
15	1' 15"	1' 27"	1' 40"	1' 53"	2' 05"	2' 18"	2' 30"	2' 43"	2' 55"	3' 08"	3' 20"	3' 33"	3' 45"
18	1' 24"	1' 38"	1' 52"	2' 06"	2' 20"	2' 34"	2' 48"	3' 02"	3' 16"	3' 30"	3' 44"	3' 58"	4' 12"
21	1' 33"	1' 49"	2' 04"	2' 20"	2' 35"	2' 51"	3' 06"	3' 22"	3' 37"	3' 53"	4' 08"	4' 24"	4' 39"
24	1' 42"	1' 59"	2' 16"	2' 33"	2' 50"	3' 07"	3' 24"	3' 41"	3' 58"	4' 15"	4' 32"	4' 49"	5' 06"
27	1' 51"	2' 10"	2' 28"	2' 46"	3' 05"	3' 24"	3' 42"	4' 01"	4' 19"	4' 38"	4' 56"	5' 15"	5' 33"
30	2'	2' 20"	2' 40"	3'	3' 20"	3' 40"	4'	4' 20"	4' 40"	5'	5' 20"	5' 40"	6'
33	2' 09"	2' 31"	2' 52"	3' 14"	3' 35"	3' 57"	4' 18"	4' 40"	5' 01"	5' 23"	5' 44"	6' 06"	6' 27"
36	2' 18"	2' 41"	3' 04"	3' 27"	3' 50"	4' 13"	4' 36"	4' 59"	5' 22"	5' 45"	6' 08"	6' 31"	6' 54"
39	2' 27"	2' 52"	3' 16"	3' 41"	4' 05"	4' 30"	4' 54"	5' 19"	5' 43"	6' 08"	6' 32"	6' 57"	7' 21"
42	2' 36"	3' 02"	3' 28"	3' 54"	4' 20"	4' 46"	5' 12"	5' 38"	6' 04"	6' 30"	6' 56"	7' 22"	7' 48"
45	2' 45"	3' 13"	3' 40"	4' 08"	4' 35"	5' 02"	5' 30"	5' 58"	6' 25"	6' 52"	7' 20"	7' 48"	8' 15"
48	2' 54"	3' 23"	3' 52"	4' 21"	4' 50"	5' 19"	5' 48"	6' 17"	6' 46"	7' 15"	7' 44"	8' 13"	8' 42"
51	3' 03"	3' 34"	4' 04"	4' 34"	5' 05"	5' 36"	6' 06"	6' 37"	7' 07"	7' 38"	8' 08"	8' 39"	9' 09"
54	3' 12"	3' 44"	4' 16"	4' 48"	5' 20"	5' 52"	6' 24"	6' 56"	7' 28"	8'	8' 32"	9' 04"	9' 36"
57	3' 21"	3' 55"	4' 28"	5' 02"	5' 35"	6' 09"	6' 42"	7' 15"	7' 49"	8' 23"	8' 56"	9' 30"	10' 03"
60	3' 30"	4' 05"	4' 40"	5' 15"	5' 50"	6' 25"	7'	7' 35"	8' 10"	8' 45"	9' 20"	9' 55"	10' 30"
63	3' 39"	4' 16"	4' 52"	5' 29"	6' 05"	6' 42"	7' 18"	7' 55"	8' 31"	9' 08"	9' 44"	10' 21"	10' 57"
66	3' 48"	4' 26"	5' 04"	5' 42"	6' 20"	6' 58"	7' 36"	8' 14"	8' 52"	9' 30"	10' 08"	10' 46"	11' 24"
69	3' 57"	4' 37"	5' 16"	5' 56"	6' 35"	7' 14"	7' 54"	8' 34"	9' 13"	9' 52"	10' 32"	11' 12"	11' 51"

Tabla 3. Tabla Breath-hold Apnea Table for Lower Embolism (BATLE® 2000), en la que en función de la profundidad alcanzada (metros) y el tiempo (minutos) total de la duración de la inmersión se indica el tiempo de intervalo en superficie (minutos, segundos) que debe permanecer el buceador para eliminar todo el gas acumulado durante dicha inmersión.

En la tabla 3 se puede observar que la primera columna indica la profundidad alcanzada o que se va a alcanzar en metros, y la primera fila indica el tiempo total de la duración de la inmersión (desde 1 a 3 minutos). En la intersección de ambos valores se indica el tiempo que el buceador de apnea debe permanecer en superficie para eliminar los gases acumulados durante la inmersión. Si el buceador realiza este protocolo correctamente, cada vez que se sumerja, será como si hiciese la primera inmersión en cuanto a saturación de gases se refiere, y así evitar sufrir un accidente de embolismo arterial gaseoso por acumulo de gases en el organismo. Los tiempos que refleja el resultado de la tabla son los tiempos mínimos de permanencia en superficie entre cada inmersión. Sin embargo, parece ser que otros factores condicionantes y predisponentes pueden tener influencia en el valor concreto del tiempo de permanencia en superficie entre

inmersiones, como el frío o calor, peso, sueño, ingesta, cansancio, entre otros. La experiencia en la aplicación de las tablas BATLE® por parte de los buceadores en apnea colaboradores pone de manifiesto que es preciso establecer un intervalo de seguridad mayor ya que la utilización de dichas tablas BATLE® especifican justo la línea de sufrir un accidente de embolismo arterial gaseoso. Por todo ello, se rehicieron las tablas con un margen de seguridad para tener en cuenta los factores predisponentes o agravantes dando lugar a las "Breath-hold Apnea Table for Lower Embolism" BATLE® 2002 de 2ª Generación (Tabla 4).

BREATH-HOLD APNEA TABLE for LOWER EMBOLISM* (BATLE®)

prof/tiempo	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180
prof/tiempo	1'	1' 10"	1' 20"	1' 30"	1' 40"	1' 50"	2'	2' 10"	2' 20"	2' 30"	2' 40"	2' 50"	3'
15	1' 45"	2' 15"	2' 30"	2' 45"	3'	3' 15"	3' 30"	4'	4' 15"	4' 30"	4' 45"	5'	5' 15"
18	2'	2' 15"	2' 45"	3'	3' 15"	3' 30"	4'	4' 15"	4' 30"	4' 45"	5' 15"	5' 30"	5' 45"
21	2' 15"	2' 30"	2' 45"	3' 15"	3' 30"	3' 45"	4' 15"	4' 30"	5'	5' 15"	5' 30"	6'	6' 15"
24	2' 15"	2' 45"	3'	3' 30"	3' 45"	4' 15"	4' 30"	4' 45"	5' 15"	5' 30"	6'	6' 15"	6' 45"
27	2' 30"	2' 45"	3' 15"	3' 30"	4'	4' 30"	4' 45"	5' 15"	5' 30"	6'	6' 15"	6' 45"	7' 15"
30	2' 30"	3'	3' 30"	3' 45"	4' 15"	4' 45"	5'	5' 30"	6'	6' 15"	6' 45"	7' 15"	7' 30"
33	2' 45"	3' 15"	3' 45"	4'	4' 30"	5'	5' 30"	5' 45"	6' 15"	6' 45"	7' 15"	7' 30"	8'
36	3'	3' 30"	3' 45"	4' 30"	4' 45"	5' 15"	5' 45"	6' 15"	6' 45"	7'	7' 30"	8'	8' 30"
39	3'	3' 30"	4'	4' 30"	5'	5' 30"	6'	6' 30"	7'	7' 30"	8'	8' 30"	9'
42	3' 15"	3' 45"	4' 15"	4' 45"	5' 15"	5' 45"	6' 15"	6' 45"	7' 15"	7' 45"	8' 15"	9'	9' 30"
45	3' 15"	4'	4' 30"	5'	5' 30"	6'	6' 30"	7' 15"	7' 45"	8' 15"	8' 45"	9' 15"	9' 45"
48	3' 30"	4'	4' 45"	5' 15"	5' 45"	6' 15"	7'	7' 30"	8'	8' 30"	9' 15"	9' 45"	10' 15"
51	3' 45"	4' 15"	4' 45"	5' 30"	6'	6' 45"	7' 15"	7' 45"	8' 30"	9'	9' 30"	10' 15"	10' 45"
54	3' 45"	4' 30"	5'	5' 45"	6' 15"	7'	7' 30"	8' 15"	8' 45"	9' 15"	10'	10' 30"	11' 15"
57	4'	4' 30"	5' 15"	5' 45"	6' 30"	7' 15"	7' 45"	8' 30"	9'	9' 45"	10' 15"	11'	11' 45"
60	4'	4' 45"	5' 30"	6'	6' 45"	7' 30"	8'	8' 45"	9' 30"	10'	10' 45"	11' 30"	12'

Tabla 4. Tabla Breath-hold Apnea Table for Lower Embolism (BATLE® de 2ª Generación)*, en la que en función de la profundidad alcanzada (metros) y el tiempo (minutos) total de la duración de la inmersión se indica el tiempo de intervalo en superficie (minutos, segundos) que debe permanecer el buceador para eliminar todo el gas acumulado durante dicha inmersión. La tabla incluye un coeficiente de corrección con el fin de que haya más seguridad.

Con un seguimiento de más de 10 años, el resultado ha sido el descenso de la casuística de accidentes de buceo en apnea. En un estudio comparativo el número de practicantes

se ha mantenido e incluso incrementado, por lo que el descenso de accidentes no puede atribuirse a una menor práctica de este deporte (Figura 10).

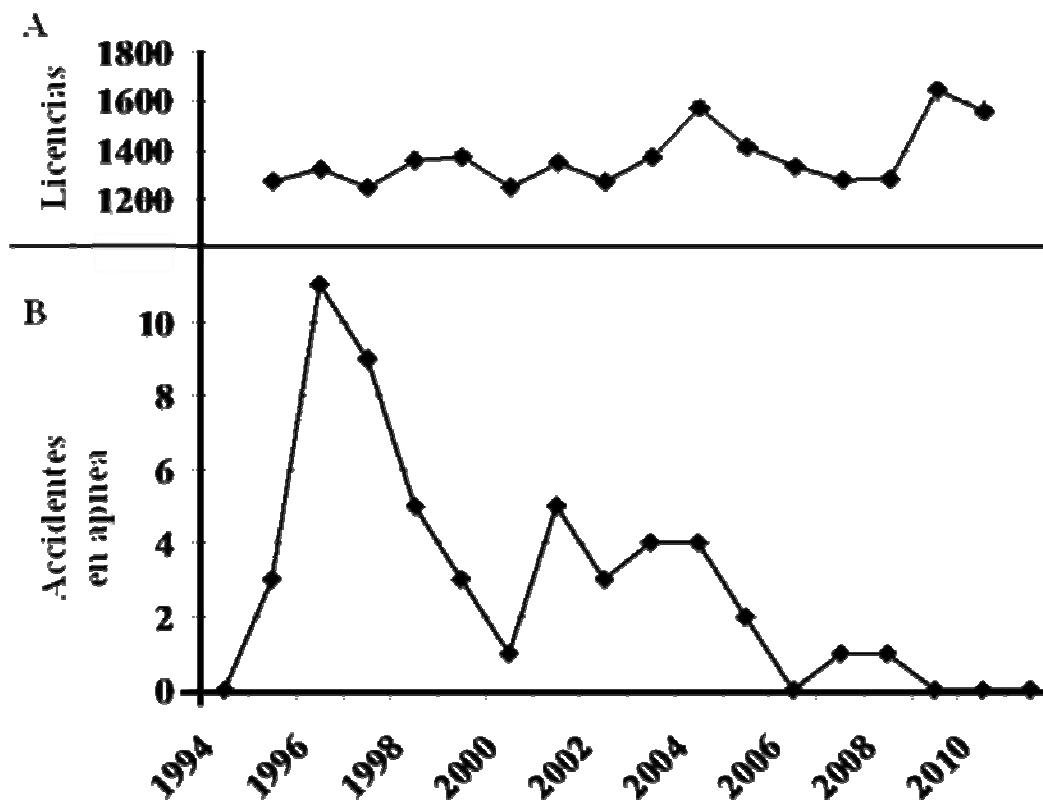


Figura 10. Representación gráfica del número de licencias federativas de buceo en apnea (A) y número de accidentes de buceo en apnea (B) desde 1994 hasta el año 2012.

5.- CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

Los casos presentados de pesca en apnea son superponibles a los accidentes disbáricos que aparecen durante el buceo con escafandra autónoma (10-13), sin embargo, los síntomas son algo diferentes por la ubicación de las burbujas formadas tras una sesión de buceo en apnea. Aún así, los resultados presentados en este trabajo demuestran que durante la estancia bajo el agua se produce una acumulación de nitrógeno y que, adicionalmente, al realizar inmersiones repetidas y con poco intervalo de recuperación en superficie el coeficiente de saturación de nitrógeno va en aumento, lo cual puede llevar a provocar embolias gaseosas y accidentes cerebro-vasculares.

En el caso de los buceadores en apnea que se sumergen a profundidades inferiores a 25 metros, el intervalo en superficie entre inmersiones deber ser igual al doble del tiempo

que ha permanecido bajo el agua y en el caso de los buceadores en apnea que superan los 25 metros el intervalo en superficie debe ser como mínimo de 8 minutos entre las bajadas. La prolongación del tiempo de permanencia en superficie después de cada inmersión en aplicación de las Tablas "Breath-hold Apnea Table for Lower Embolism" BATLE® de 2ª Generación, y de la regla nemotécnica, han resultado ser un mecanismo eficaz en la prevención de los accidentes disbáricos por la práctica de deportes en apnea desde su instauración. Las Tablas han demostrado su utilidad y han hecho que los accidentes debidos a la formación de burbujas por el exceso de nitrógeno a consecuencia del tiempo de estancia bajo el agua haya disminuido de forma significativa pasando de una media de cinco casos por año antes de la divulgación de las tablas a una media inferior a un caso por año.

En conclusión, la aplicación de las tablas BATLE® son una buena herramienta en la prevención de los accidentes disbáricos que se pueden producir mediante la práctica de deportes en apnea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Desola J.**, Celerius, profundius, periculosius. (Editorial). *Med Clin (Barc)* 1995;104(19):739-41.
2. **Batle J.M.** Decompression sickness caused by breath-hold diving hunting. 13th International Congress in Hyperbaric Medicine. Kobe Japan 1999: 87
3. **Moya J., Fernandez A., Cañellas A., Gestoso S.**, Aspectos médico fisiológicos del cazador submarino menorquín. *Medicina Balear* Vol.14, nº 1 (40-44)
4. **López B., Campos F.**, Accidente disbárico en pesca submarina. *Med Cin (Barc)* 1995; 104: 742-743.
5. **Batle J.M., Campos F.**, Panorámica de la asistencia hiperbárica en Mallorca Jornada Internacional de Medicina Hiperbárica 3º Congreso del CCCMH Barc-1997: 98
6. **Salinas Cascales A, Desola Alà J, Sala-Sanjaume J, Crespo Alonso A.** Accidentes disbaricos en el buceo en apnea: a proposito de cuatro casos. *Emergencias* 1996; 8: 190-191
7. **Radermacher, P, Santak, CM, Muth, CM.** Nitrogen partial pressures in man after decompression from simulated SCUBA dives at rest and during exercise. *Undersea Biomed. Res.* 1990; 17: 495-501.
8. **Radermacher, P.** Nitrogen tensions in brachial vein blood of Korean ama divers. *J. Appl. Physiol.* 1992; 73(6): 2592-2595.
9. **Rademacher, P. Muth, CM, Staschen CM, Warninghoff V, Van Laak V.:** Exercise effects on central venous nitrogen tensions after simulated non-decompression dives. *Proceedings of the XIXth Annual Meeting of European Undersea Biomedical Society in Trondheim, Norway* 1993.
10. **Vank RD.** Decompression theory and applications. In: *The Physiology and Medicine of Diving*, edited by P.B. Bennett and DH Elliott. London: Ballière Tindall. 1982. 352-382.
11. **Tikuissis P, Nishi RY:** Application of bubble models to the prediction of decompression sickness using maximum likelihood. *Proceedings of the XIXth*

- Annual Meeting of European Undersea Biomedical Society in Trondheim, Norway 1993.
12. **Desola J.** “ Accidentes de buceo (I) Enfermedad Descompresiva “ Medicina Clínica nº 94, Barcelona 1990.
 13. **Francis TJR, Smith DJ.** Describing Decompression Illness. 42 Undersea & Hyperbaric Medical Society Workshop. Bethesda, Maryland:UHMS, 1991(79).
 14. **Wendling J, Switzerland B.** Epidemiology, Clinical Manifestation and Treatment Results of Recreational Diving Accidents. Proceedings of the 2nd European Consensus Conference Treatment of decompression accidents in recreational diving. Marseilles 1996.
 15. **Desola Ala J.** Accidentes de buceo (3). Tratamiento de los trastornos disbáricos embolígenos. Med Clin (Barc) 1990; 95(7):265-275.
 16. **Ferrigno M, Lundgren C.** Human breath-hold diving. In: Lundgren CEG, Miller JN, eds The lung at depth. New York: Marcel Dekker; 1999: 532,574
 17. **Craig AB Jr.** Depth limits of breath-hold diving (an example of fennology). Respir Physiol 1968; 5:14-22.
 18. **Schaefer KE, Allison RD, Dougherty JH, et al.** Pulmonary and circulatory adjustments determining the limits in breathhold diving. Science 1968; 162: 1020-1023.
 19. **Hamilton Jr RW.** et al. Development and validation of no-stop decompression procedures for recreational diving. Hamilton Research Clinical Hyperbaric Technologies, Inc.
 20. **Batle JM.,** “Protocolo de Actuación en Accidentes Subacuáticos”. I Jornadas de Emergencias Balears 1997 64-74
 21. **Oriani G., Marroni A., Wattel F.,** Handbook on Hyperbaric Medicine, “Pre-Hospital Treatment of descompresion Sickness in recreational Divers” Seyer J., 1995
 22. **Batle J.M.** “Attitude a breath hold diver should take to avoid Arterial Gas Embolism. A study of about 30 cases.” Proceedings 26th Annual Scientific Meeting EUBS 2000: 143-149

23. **Batle J.M.** “How to avoid arterial Gas Embolism in free diving the attitude a breath hold diver should take. Retrospective study of 35 cases.” Proceedings 14th ICHM 2002: 107-112

5. RECAPITULACIÓN

5. RECAPITULACIÓN

El oxígeno es indispensable para la vida, sin embargo también tiene una potencialidad tóxica. La toxicidad del oxígeno se explica por la producción de radicales libres del oxígeno que se generan continuamente como parte fundamental de los procesos metabólicos celulares (Jackson et al. 2007). Los radicales libres de oxígeno y de nitrógeno constituyen también un conjunto de moléculas señalizadores indispensables para promover multitud de procesos celulares entre los que se incluyen los de adaptación ambiental como la realización actividad física intensa, la hiperoxia y la hiperbaria (Ferrer et al. 2010; Radak et al. 2013; Sureda et al. 2004a; Yogaratnam et al. 2006). Cuando se produce un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y los mecanismos responsables de su eliminación aparece una situación de estrés oxidativo. El ejercicio físico, en el cual se produce un aumento significativo del consumo de oxígeno para hacer frente a la fuerte demanda energética, la exposición a presiones elevadas de oxígeno propias de la terapia hiperbárica o del buceo con escafandra a gran profundidad, o episodios repetitivos de hipoxia/reoxigenación son situaciones que afectan al equilibrio oxidativo del organismo (Mastaloudis et al. 2001; Narkowicz et al. 1993). Hemos analizado cómo estas situaciones de exposición a diferentes concentraciones de oxígeno podrían alterar la producción de ROS en células del sistema inmunitario, la activación de los mecanismos de defensa antioxidante y la aparición de daño oxidativo en los diferentes compartimentos sanguíneos.

5.1. Adaptaciones antioxidantes al oxígeno hiperbárico y al ejercicio físico

La práctica de un ejercicio físico intenso o de larga duración produce una respuesta inmunitaria similar a la respuesta inmunitaria de fase aguda, caracterizada por un aumento significativo en el número de neutrófilos circulantes (Tauler et al. 2002). La práctica de buceo con escafandra a gran profundidad es capaz de inducir neutrofilia acompañada de una disminución de la actividad mieloperoxidasa (MPO) y la capacidad de generar ROS. Parece ser que la combinación de hiperoxia y actividad física, consecuencia del buceo, podría inhibir la maquinaria oxidativa del neutrófilo para así, reducir la sensibilidad a estímulos inmunitarios, evitando de esta manera respuestas

autoinmunes y facilitando la reparación muscular derivada del ejercicio físico. En estudios previos se han obtenido resultados similares al estudiar la práctica deportiva de pesca submarina en apnea, con una disminución de la explosión oxidativa del neutrófilo (Sureda et al. 2004c). En cambio, una sesión de terapia hiperbárica no es suficiente para inducir cambios en la capacidad oxidativa del neutrófilo, ni induce una situación de neutrofilia.

Al analizar la expresión de genes relacionados con marcadores de inflamación y la síntesis de citoquinas en neutrófilos se evidencia un aumento significativo en la expresión de la IL-6, IL-8, IL-10, IL1b y HSP72. Sin embargo, no se observan cambios en la expresión del TNF α y MPO. El TNF α es un marcador clásico de inflamación producida por una infección, mientras que la respuesta asociada al ejercicio no provoca su incremento plasmático (Hopps et al. 2011). Así, la respuesta en citoquinas evidenciada después del buceo en apnea se asemeja más a la respuesta inducida por el ejercicio físico que a la producida por una infección.

La expresión de genes relacionados con la síntesis de óxido nítrico y mediadores lipídicos también se ve influenciada por el buceo con escafandra. Se incrementa de forma significativa la expresión del NF κ B, el receptor Toll-like 4 (TLR4), COX-2, 5-LOX y la iNOS. Al estimularse los TLRs, éstos participan en la activación del NF κ B pudiendo jugar un papel importante en la regulación de los mediadores de inflamación asociados al buceo con escafandra (Zbinden-Foncea et al. 2012). Estos resultados sugieren que el aumento de la producción de especies reactivas inducidas por el buceo puede estar relacionado con el incremento en la expresión de los genes analizados.

Los niveles de nitrotirosina en neutrófilos se ven incrementados tras la práctica de buceo en apnea de acuerdo con un aumento en la concentración de nitrito, como marcador de la producción de óxido nítrico. El incremento en el óxido nítrico es independiente de la concentración de iNOS presente en las células, sugiriendo un estado de mayor activación del enzima y/o de más disponibilidad de sustratos (L-arginina y NADPH). El aumento en los niveles de nitrotirosina refleja la producción de peroxinitrito que deriva de la reacción entre el óxido nítrico y el anión superóxido (Bouayed and Bohn, 2010), sugiriendo también una mayor producción del anión superóxido tras el buceo.

Otro de los efectos conocidos que produce el ejercicio intenso y de larga duración es una disminución del número de linfocitos circulantes (Sureda et al. 2005). Esta linfopenia se asocia con la aparición de un período con mayor susceptibilidad de padecer infecciones, sobretodo de las vías respiratorias altas. No se detectaron cambios significativos en el número de linfocitos tras la sesión de buceo con escafandra, lo que indica que el ejercicio realizado durante la inmersión fue de una intensidad moderada y no exhaustiva. La exposición en reposo a oxígeno hiperbárico tampoco los aumenta, indicando que la exposición a niveles incrementados de oxígeno no es suficiente para modificar el número de linfocitos circulantes.

La producción de ROS por parte de los linfocitos se ve claramente influenciada por el ejercicio físico y la exposición a niveles elevados de oxígeno. Tras la sesión de buceo y tras la sesión en la cámara hiperbárica se detecta un aumento significativo en la producción de especies reactivas. Este aumento se observa tanto en linfocitos en condiciones basales (no activados) como en linfocitos activados con PMA. Estos resultados indican que en los linfocitos no sólo se ve aumentada su capacidad de producción de ROS ante un estímulo, sino que también se incrementa su producción basal. En este caso, a diferencia de lo que se observa en los neutrófilos, la exposición en reposo a oxígeno hiperbárico es por si sola suficiente para incrementar la producción linfocitaria de ROS, manifestando así la importancia de la tensión de oxígeno en la producción celular de especies reactivas. Esta mayor producción de ROS por parte del linfocito coexiste con la activación de las defensas antioxidantes enzimáticas. Analizando los resultados obtenidos, la glutatión peroxidasa es la enzima activada con mayor presteza en respuesta al estrés oxidativo inducido por el buceo y a la exposición a oxígeno hiperbárico, si bien la catalasa también se ve activada durante el período de recuperación. La hemooxigenasa 1 (HO-1) es otra de las defensas antioxidantes que ve incrementada su expresión tanto tras la sesión de buceo como tras la terapia hiperbárica.

Los niveles de nitrito como marcador del óxido nítrico (NO) y de los niveles proteicos de la iNOS en linfocitos, aumentan de forma significativa durante el período de recuperación tras una inmersión con botella. Sin embargo, la terapia hiperbárica no permite observar este incremento al no tener toma de muestras tras un período de recuperación, aunque la tendencia es a incrementar sus niveles. El NO puede producir tanto efectos beneficiosos como perjudiciales en función de su concentración (Bredt and Snyder 1994; Gross and Wolin 1995). Cuando los valores son bajos, el NO actúa como mensajero celular regulando multitud de vías de señalización. En elevadas

concentraciones, facilita el daño celular a través de la formación de compuestos citotóxicos como el peroxinitrito, generado en la reacción entre el NO y el anión superóxido (Fukuyama et al. 1996). En otros estudios previos, se han evidenciado un aumento de la iNOS y a la vez de la Mn-SOD con la finalidad de evitar los posibles efectos negativos asociados al incremento en la producción de NO.

Evidenciada la mayor producción linfocitaria de ROS asociada a la sesión de buceo y a la hiperbaria y la activación de las defensas antioxidantes se determinó si aparecía una situación de desequilibrio oxidativo capaz de inducir daños en componentes celulares. Los niveles de malondialdehído (MDA), como indicador de peroxidación lipídica, no se ven alterados en ninguno de los estudios. Así, la respuesta antioxidante del linfocito es suficiente para prevenir la aparición de daño oxidativo inducido por el buceo.

Los eritrocitos suponen el componente celular mayoritario de la sangre y constituyen un buen indicador del grado de estrés oxidativo, ya que al ser incapaz de sintetizar proteínas es más propenso a sufrir daño en sus biomoléculas (Sureda et al. 2005). En los eritrocitos únicamente se observa un incremento de la actividad glutatión peroxidasa determinada con un hidroperóxido. Estos resultados indicarían un aumento de la peroxidación lipídica asociada a la inmersión con escafandra, que sin embargo, quedaría contrarrestada por el aumento de la actividad de la glutatión peroxidasa, ya que no se observó un incremento de los niveles de MDA.

Los niveles de nitrito en los eritrocitos aumentan de forma significativa durante el período de recuperación tras la jornada de buceo. Los eritrocitos juegan un papel importante durante los procesos hipóxicos. Se ha sugerido que el nitrito eritrocitario sería una forma de almacenar NO, que se pondría a disposición en tejidos hipóxicos para transformarse de nuevo en NO (Gladwin et al. 2004) y generar vasodilatación que contribuiría a disminuir la situación de hipoxia. La hiperoxia derivada del buceo induciría una vasoconstricción periférica que derivaría en hipoxia tisular, lo que induciría un aumento en la producción del NO eritrocitario, que contribuiría a poder revertir la situación de hipoxia periférica.

La situación oxidativa del plasma es considerada como un buen marcador del balance oxidativo global del organismo. Los niveles plasmáticos de la creatina quinasa (CK) y la lactato deshidrogenasa (LDH) se utilizan como indicadores de daño y lisis

celular, especialmente muscular y eritrocitaria (Tauler et al. 2006). El buceo con escafandra induce un aumento de ambos marcadores, mientras que una sesión de terapia hiperbárica no los altera. Estos resultados descartan la elevada tensión de oxígeno como responsable de este daño celular y apunta más al desgaste provocado por la actividad física. Al observar la respuesta de las defensas antioxidantes se observa un aumento de la catalasa y la superóxido dismutasa tras la inmersión con escafandra. Los enzimas antioxidantes en plasma pueden provenir de diferentes fuentes celulares, pero se ha hipotetizado que el neutrófilo podría ser en gran parte responsable, al secretar enzimas al medio extracelular en respuesta al ejercicio físico. Al igual que en el caso de los linfocitos, el incremento de las defensas antioxidantes es suficiente para evitar la aparición de daño oxidativo.

El buceo a gran profundidad induce una disminución de los niveles plasmáticos de endotelina-1 y un aumento de la síntesis de NO, lo que puede contribuir a controlar la vasodilatación tras la práctica del buceo. Además, se observa un aumento en los niveles plasmáticos del factor de crecimiento vascular, el cual podría contribuir a la estimulación de la resistencia tisular al daño oxidativo inducido por el buceo con escafandra.

5.2. Adaptaciones antioxidantes a la hipoxia y al ejercicio físico

El entrenamiento aumenta la capacidad de las células musculares y sanguíneas para contrarrestar la acción de las ROS generadas durante el ejercicio intenso o tras hipoxia-reoxigenación, básicamente incrementando la actividad de enzimas antioxidantes (Alessio 1993). La situación de hipoxia seguida de reoxigenación induce estrés oxidativo y su repetición se ha asociado a una gran variedad de enfermedades, incluido el infarto de miocardio (Li and Jackson 2002). El estudio de los mecanismos moleculares de inducción de tolerancia frente al daño oxidativo es de gran importancia atendiendo las repercusiones negativas que producen la ROS. Para evidenciar la existencia de procesos adaptativos en las células inmunitarias que generen tolerancia frente al estrés oxidativo se ha utilizado un modelo de ejercicio físico de pesca submarina en apnea, repetido en diferentes jornadas. El ejercicio se combina con episodios repetitivos de hipoxia-reoxigenación. Se ha realizado un seguimiento de cinco jornadas consecutivas de pesca en apnea en la que participaron deportistas de élite. Una jornada de pesca en apnea durante 4 horas supone permanecer más de una hora sin respirar en condiciones de hipoxia. Tras las cinco jornadas de pesca, los

neutrófilos en condiciones basales, presentan una mayor capacidad antioxidante, mientras que la capacidad de producción de ROS en respuesta a estímulos externos, si bien no resultó inhibida, sí que estaba retrasada en el tiempo. El mecanismo de adaptación celular de los neutrófilos proporciona un incremento de la actividad basal de los enzimas antioxidantes catalasa y tioredoxina reductasa. La adaptación inducida en los neutrófilos que los protege del estrés oxidativo no evita la aparición de daño oxidativo en plasma (Sureda et al. 2004b). De hecho, la actividad plasmática del enzima xantina oxidasa se incrementa tras las sesiones de buceo pudiendo contribuir al aumento en la producción de ROS y, en consecuencia, en la instauración de estrés oxidativo. El retraso en la producción de especies reactivas evidenciada tras situaciones repetitivas de hipoxia-reoxigenación podría contribuir a evitar posibles daños asociados a la activación y producción de ROS por la acción de los neutrófilos, y facilitar su participación en la reparación de daño muscular. En el caso de las células polimorfonucleadas se observa también una activación de los mecanismos de defensa antioxidantes sin evidentes indicios de daño oxidativo tras la práctica del buceo en apnea. La elevada producción de óxido nítrico, determinando los niveles de nitrito, así como el incremento en la producción de ROS podrían actuar como señales celulares e inducir la activación de las defensas antioxidantes (Cantu-Medellin and Kelley 2013).

5.3. Mecanismos moleculares de acción de la oxigenoterapia hiperbárica

Existen numerosos cuadros clínicos donde el elemento principal es la hipoxia, y la exposición de manera intermitente de los pacientes al oxígeno hiperbárico, sola o principalmente relacionada con otros procedimientos médico-quirúrgicos estimula varios procesos biológicos que favorecen la curación. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en sus efectos curativos no están bien elucidados. La utilización de la oxigenoterapia hiperbárica en pacientes con heridas cronificadas de difícil curación induce un aumento plasmático en la actividad catalasa después de cada sesión y una disminución de la actividad mieloperoxidasa, indicando un efecto antioxidante y antiinflamatorio que puede contribuir al proceso de curación. Además, marcadores de daño oxidativo y tisular como son los niveles de MDA y la actividad creatina quinasa también se van reduciendo a lo largo de los tratamientos.

Cada sesión de tratamiento induce un aumento en los niveles plasmáticos de VEGF y nitrito, mientras que los niveles de endotelina-1 se ven disminuidos al llegar a la sesión

número 20. El VEGF se considera uno de los mediadores más importantes de la angiogénesis, mientras que la endotelina-1 presenta propiedades vasoconstrictoras, contribuyendo a mantener el tono vascular basal y la presión arterial (Gordillo et al. 2008; Sander et al. 2009). Los niveles incrementados de NO se han asociado con la angiogénesis mediada por el VEGF (Luo and Chen 2005). Estos resultados, sugieren la participación de estos mediadores en la angiogénesis y la regeneración tisular inducida por la oxigenoterapia hiperbárica.

5.4. Protocolo de actuación para evitar accidentes disbáricos en la práctica de deportes en apnea

Hoy en día los practicantes de deportes acuáticos han aumentado muchísimo en las costas de las Baleares. Al aumentar la presión ejercida por los pescadores submarinos sobre sus presas, ha provocado que la pesca sea cada vez más escasa y las grandes piezas estén a mayor profundidad. Todo ello supone que se tenga que recurrir a mayores profundidades, de hasta más de 40 metros, y permanecer entre 2 y 3 minutos bajo el agua en apnea. Además, estos deportistas únicamente permanecían unos pocos minutos en superficie antes de iniciar una nueva inmersión. Como resultado, empezaron a aparecer accidentes debidos a la formación de burbujas por el exceso de nitrógeno acumulado en los tejidos de los apneistas derivado del acumulo de tiempos de inmersión sumado al corto tiempo de recuperación. Sin embargo, en un primer momento se pensó que los accidentes derivaban del sobreesfuerzo asociado a la pesca o una causa casual ajena a las inmersiones, pero después se demostró que había lesión cerebral, claramente atribuible a las inmersiones profundas y repetidas frecuentemente.

Desde la constitución de MEDISUB de Institut Recerca Hiperbárica en el año 1995 se ha realizado el seguimiento de todos los accidentes producidos en aguas de las Islas Baleares. Al analizar los perfiles de las inmersiones de los accidentados con los perfiles de sujetos sanos y sin ningún tipo de problemática, se pudo constatar que el principal problema derivaba del escaso tiempo en superficie entre inmersiones. Los accidentados presentaban lesiones similares a los accidentes por descompresión con escafandra autónoma, caracterizada por embolismo gaseoso y accidente cerebrovascular. Del análisis de los datos obtenidos se elaboraron las tablas Breath Hold Apnea Tables for Lower Embolism para intentar dar solución al progresivo aumento en los accidentes disbáricos producidos por la pesca en apnea. Desde la instauración y

aplicación de las tablas, el número de accidentes ha ido disminuyendo paulatinamente hasta la actualidad, evidenciando la utilidad de las mismas y de la necesidad de una correcta planificación de las inmersiones realizadas en apnea.

6. CONCLUSIONES

6. Conclusiones

1. Episodios repetitivos de buceo en apnea durante cinco días consecutivos indujeron adaptaciones en los neutrófilos que se evidenciaron con un retraso en la explosión respiratoria y una activación de los mecanismos de defensa antioxidante para evitar el daño oxidativo en estas células que, sin embargo, fue evidente en el plasma.
2. Períodos repetitivos de buceo en apnea durante cinco días consecutivos incrementaron la actividad xantina oxidasa en plasma y la producción de óxido nítrico en células polimorfonucleares, lo cual puede favorecer la actividad de las ROS como mensajeros celulares y provocar una adaptación antioxidante frente a la hipoxia/reoxigenación en estas células.
3. La exposición a oxígeno hiperbárico en ausencia de ejercicio físico no indujo cambios significativos en el hemograma ni en la bioquímica; sin embargo, fue suficiente para incrementar la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) y activar las defensas antioxidantes en linfocitos.
4. La combinación de hiperbaria y actividad física, a través del buceo con escafandra autónoma a 40 metros de profundidad, indujo una situación de estrés oxidativo con daño muscular y una respuesta inmunitaria de fase aguda.
5. Los neutrófilos no mostraron cambios significativos tras la exposición a oxígeno hiperbárico. La jornada de buceo con escafandra resultó en una disminución del grado de activación de los neutrófilos, probablemente debido a la movilización de neutrófilos más inmaduros provenientes de la médula ósea.
6. El plasma, los eritrocitos y los linfocitos respondieron a una situación de buceo con escafandra con un incremento en las defensas antioxidantes, suficiente para neutralizar la mayor producción de ROS y evitar la aparición de daño oxidativo.

7. Una sesión de buceo a 40 metros de profundidad con escafandra produjo un aumento en los niveles de nitrito en plasma, eritrocitos y linfocitos. En los linfocitos, este aumento parece ser consecuencia de la activación de la isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa. La activación de las defensas antioxidantes en plasma y en los eritrocitos favorecieron el incremento de los niveles de óxido nítrico al aumentar la capacidad de eliminación del anión superóxido, evitando que reaccionen y reduciendo la formación de peroxinitrito.
8. Una sesión de buceo a 50 metros de profundidad con escafandra activó la respuesta antioxidante en plasma, aunque no fue suficiente para evitar el estrés oxidativo vascular. La reducción de los niveles de endotelina-1 junto al incremento en la síntesis de óxido nítrico pueden contribuir al control del tono vascular durante y tras el buceo
9. El buceo con escafandra a gran profundidad incrementó los niveles del factor de crecimiento vascular (VEGF) que puede activar cascadas de señalización, estimulando la resistencia tisular frente al estrés oxidativo inducido por el buceo.
10. Una sesión de buceo a 50 metros indujo una respuesta inflamatoria en neutrófilos con un aumento de la expresión de genes relacionados con la inflamación y con las vías de señalización y síntesis del óxido nítrico y mediadores lipídicos.
11. El tratamiento con oxigenoterapia hiperbárica en pacientes con heridas de difícil curación no produjo cambios en el hemograma y enzimas antioxidantes en eritrocitos. En plasma indujo una respuesta antioxidante incrementando la actividad catalasa y reduciendo la actividad mieloperoxidasa y marcadores de daño oxidativo.
12. La oxigenoterapia hiperbárica durante veinte tratamientos incrementó los niveles plasmáticos de VEGF y redujo los de endotelina-1, pudiendo contribuir en los mecanismos moleculares de curación de heridas cronificadas.

13. Los estudios de seguimiento de los accidentes disbáricos en apnea han demostrado que al igual que en el buceo con escafandra se acumula nitrógeno en los tejidos siendo el responsable del embolismo arterial gaseoso.
14. La aplicación de las Tablas Breath-hold Apnea Tables for Lower Embolism (BATLE 2000) han resultado ser un mecanismo eficaz en la prevención de los accidentes disbáricos por la práctica de deportes en apnea desde su instauración. El número de accidentes se ha reducido de forma significativa en los últimos años pasando de unos cinco casos anuales antes de la instauración de las tablas a únicamente uno desde ese momento.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- Alessio HM (1993) Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25: 218-224
- Alessio HM (2000) Lipid peroxidation in healthy and diseased models: influence of different types of exercise. In Sen CK, Parker L, Hänninen O (eds) *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise* Elsevier Amsterdam: pp 115-127
- Allen RG, Tresini M (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28: 463-499
- Babior BM (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109: 33-44
- Battle JM (1999) Decompression sickness caused by breath-hold diving hunting. 13th International Congress in Hyperbaric Medicine. Kobe Japan 87
- Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, Pagliarini S, Benvenuti F, Canestrari F (2004) Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin Biochem* 37: 312-317
- Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH (2008) Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gend Med* 5: 218-228
- Boussuges A, Blanc F, Carturan D (2006) Hemodynamic changes induced by recreational scuba diving. *Chest* 129: 1337-1343
- Bredt DS, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 63: 175-195
- Burdon RH (1996) Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 24: 1028-1032
- Burton GW, Traber MG (1990) Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* 10: 357-382
- Cantu-Medellin N, Kelley EE (2013) Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how. *Nitric Oxide* 34: 19-26
- Cepinskas G, Lush CW, Kvietys PR (1999) Anoxia/reoxygenation-induced tolerance with respect to polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured endothelial cells. A nuclear factor-kappaB-mediated phenomenon. *Circ Res* 84: 103-112
- Clarkson PM, Thompson HS (2000) Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 72: 637S-646S

- Choi AM, Alam J (1996) Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 9-19
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1198-1205
- Dennery PA (2000) Regulation and role of heme oxygenase in oxidative injury. *Curr Top Cell Regul* 36: 181-199
- Dennog C, Hartmann A, Frey G, Speit G (1996) Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis* 11: 605-609
- Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G (1999) Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 428: 83-89
- Dujic Z, Valic Z, Brubakk AO (2008) Beneficial role of exercise on scuba diving. *Exerc Sport Sci Rev* 36: 38-42
- Elbirt KK, Bonkovsky HL (1999) Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians* 111: 438-447
- Elias SJ, Arner ES, Zhong L, Holmgren A (1999) In: Packer L (ed) *Methods in Enzymology. Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, California vol. 300: pp 226-239
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81-128
- Etlik O, Tomur A, Dundar K, Erdem A, Gundogan NU (1997) The effect of antioxidant vitamins E and C on lipoperoxidation of erythrocyte membranes during hyperbaric oxygenation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 8: 269-277
- Fehrenbach E, Veith R, Schmid M, Dickhuth HH, Northoff H, Niess AM (2003) Inverse response of leukocyte Heat Shock Proteins and DNA damage to exercise and heat. *Free Rad Res* 37: 975-982
- Feldmeier H (2003) Hyperbaric oxygen: indications and results; the hyperbaric oxygen therapy committee report. Undersea and Hyperbaric Medical Society
- Ferrer MD, Sureda A, Mestre A, Tur JA, Pons A (2010) The double edge of reactive oxygen species as damaging and signaling molecules in HL60 cell culture. *Cell Physiol Biochem* 25: 241-252
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247

- Forman HJ, Torres M (2002) Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 166: S4-8
- Fridovich I (1986) Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247: 1-11
- Fukuyama N, Ichimori K, Su Z, Ishida H, Nakazawa H (1996) Peroxynitrite formation from activated human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 414-419
- Gladwin MT, Crawford JH, Patel RP (2004) The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic Biol Med* 36: 707-717
- Gordillo GM, Roy S, Khanna S, Schlanger R, Khandelwal S, Phillips G, Sen CK (2008) Topical oxygen therapy induces vascular endothelial growth factor expression and improves closure of clinically presented chronic wounds. *Clin Exp Pharm Physiol* 35: 957-964
- Gröger M, Speit G, Radermacher P, Muth CM (2005) Interaction of hyperbaric oxygen, nitric oxide, and heme oxygenase on DNA strand breaks in vivo. *Mutat Res* 572: 167-172
- Gross SS, Wolin MS (1995) Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 57: 737-769
- Halliwell B (1994) Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344: 721-724
- Halliwell B, Gutteridge JE (1989) *Free radicals in biology and medicine*, 2 ed. Clarendon Press, Oxford
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007-3017
- Harabin AL, Braisted JC, Flynn ET (1990) Response of antioxidant enzymes to intermittent and continuous hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* 69: 328-335
- Hartmann A, Niess AM (2000) Oxidative DNA damage in exercise. In Sen CK, Parker L, Hänninen O (eds) *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise* Elsevier Amsterdam: pp 195-217
- Hinneburg I (2013) [Prevention, diagnosis and therapy of the diabetic foot]. *Med Monatsschr Pharm* 36: 292-296; quiz 297-298
- Hopps E, Canino B, Caimi G (2011) Effects of exercise on inflammation markers in type 2 diabetic subjects. *Acta Diabetol* 48: 183-189

- Jackson MJ (2000) Exercise and oxygen radical production by the muscle. In: Sen, C.K., Packer, L., Hanninen, O., eds. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise* Amsterdam, Elsevier, pp 57-68
- Jackson MJ, Pye D, Palomero J (2007) The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol* 102: 1664-1670
- Jenkins RR (1988) Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med* 5: 156-170
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Steinhafel N, Vina J (2004) Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. *Faseb J* 18: 1499-1506
- Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, Tagaya M, Ohtsuki T, Hata R, Ueda H, Handa N, Kimura K, Kamada T (1991) 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res* 561: 203-211
- Labrousse S, Javorschi S, Leroy D, Gbikpi-Benissan G, Freyburger G (1999) Influence of hyperbaric oxygen on leukocyte functions and haemostasis in normal volunteer divers. *Thromb Res* 96: 309-315
- Lauer N, Suvorava T, Ruther U, Jacob R, Meyer W, Harrison DG, Kojda G (2005) Critical involvement of hydrogen peroxide in exercise-induced up-regulation of endothelial NO synthase. *Cardiovasc Res* 65: 254-262
- Lee HC, Wei YH (1997) Role of Mitochondria in Human Aging. *J Biomed Sci* 4: 319-326
- Lemaitre F, Joulia F, Chollet D (2010) Apnea: a new training method in sport? *Med Hypotheses* 74: 413-415
- Li C, Jackson RM (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C227-241
- Luo JD, Chen AF (2005) Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol* 26: 259-264
- Mader JT, Wilson KJ (1981) Actinomycosis: a review and the utilization of hyperbaric oxygen. *HBO Review* 2: 177-188
- Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG (2001) Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 31: 911-922
- McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163
- Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760

- Mikkelsen RB, Wardman P (2003) Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22: 5734-5754
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142
- Morozov VI, Pryatkin SA, Kalinski MI, Rogozkin VA (2003) Effect of exercise to exhaustion on myeloperoxidase and lysozyme release from blood neutrophils. *Eur J Appl Physiol* 89: 257-262
- Narkowicz CK, Vial JH, McCartney PW (1993) Hyperbaric oxygen therapy increases free radical levels in the blood of humans. *Free Radic Res Commun* 19: 71-80
- O'Brien P (2000) Peroxidases. *Chem Biol Interact* 129: 113-139.
- Oter S, Korkmaz A, Topal T, Ozcan O, Sadir S, Ozler M, Ogur R, Bilgic H (2005) Correlation between hyperbaric oxygen exposure pressures and oxidative parameters in rat lung, brain, and erythrocytes. *Clin Biochem* 38: 706-711
- Packer JE, Slater TF, Willson RL (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278: 737-738
- Packer L (1991) Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr* 53: 1050S-1055S
- Pantopoulos K, Mueller S, Atzberger A, Ansorge W, Stremmel W, Hentze MW (1997) Differences in the regulation of iron regulatory protein-1 (IRP-1) by extra- and intracellular oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 9802-9808.
- Pattwell DM, Jackson MJ (2004) Contraction-induced oxidants as mediators of adaptation and damage in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev* 32: 14-18
- Powers SK, Sen CK (2000) Physiological antioxidants and exercise training. In Sen CK, Parker L, Hänninen O (eds) *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise* Elsevier Amsterdam: pp 221-242
- Pryor WA, Squadrito GL (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268: L699-722
- Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M (2013) Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal* 18: 1208-1246
- Rice-Evans CA, Miller NJ (1996) Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans* 24: 790-795

- Rothfuss A, Dennog C, Speit G (1998) Adaptive protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis* 19: 1913-1917
- Rothfuss A, Radermacher P, Speit G (2001) Involvement of heme oxygenase-1 (HO-1) in the adaptive protection of human lymphocytes after hyperbaric oxygen (HBO) treatment. *Carcinogenesis* 22: 1979-1985
- Rubbo H, Radi R, Anselmi D, Kirk M, Barnes S, Butler J, Eiserich JP, Freeman BA (2000) Nitric oxide reaction with lipid peroxyl radicals spares alpha-tocopherol during lipid peroxidation. Greater oxidant protection from the pair nitric oxide/alpha-tocopherol than alpha-tocopherol/ascorbate. *J Biol Chem* 275: 10812-10818
- Sander AL, Henrich D, Muth CM, Marzi I, Barker JH, Frank JM (2009) In vivo effect of hyperbaric oxygen on wound angiogenesis and epithelialization. *Wound Repair Regen* 17: 179-184
- Schinetti ML, Sbarbati R, Scarlattini M (1989) Superoxide production by human umbilical vein endothelial cells in an anoxia-reoxygenation model. *Cardiovasc Res* 23: 76-80
- Sheikh AY, Gibson JJ, Rollins MD, Hopf HW, Hussain Z, Hunt TK (2000) Effect of hyperoxia on vascular endothelial growth factor levels in a wound model. *Arch Surg* 135: 1293-1297
- Speit G, Dennog C, Eichhorn U, Rothfuss A, Kaina B (2000) Induction of heme oxygenase-1 and adaptive protection against the induction of DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis* 21: 1795-1799
- Speit G, Dennog C, Lampl L (1998) Biological significance of DNA damage induced by hyperbaric oxygen. *Mutagenesis* 13: 85-87
- Starke DW, Chen Y, Bapna CP, Lesnefsky EJ, Mielal JJ (1997) Sensitivity of protein sulfhydryl repair enzymes to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 23: 373-384
- Sureda A, Batle JM, Tauler P, Aguilo A, Cases N, Tur JA, Pons A (2004a) Hypoxia/reoxygenation and vitamin C intake influence NO synthesis and antioxidant defenses of neutrophils. *Free Radic Biol Med* 37: 1744-1755
- Sureda A, Batle JM, Tauler P, Aguilo A, Cases N, Tur JA, Pons A (2004b) Neutrophil tolerance to oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation. *Free Radic Res* 38: 1003-1009

- Sureda A, Batle JM, Tauler P, Cases N, Aguilo A, Tur JA, Pons A (2004c) Neutrophil tolerance to oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation. *Free Rad Res* 38: 1003-1009
- Sureda A, Tauler P, Aguilo A, Cases N, Fuentespina E, Cordova A, Tur JA, Pons A (2005) Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Rad Res* 39: 1317-1324
- Suzuki K, Sato H, Kikuchi T, Abe T, Nakaji S, Sugawara K, Totsuka M, Sato K, Yamaya K (1996) Capacity of circulating neutrophils to produce reactive oxygen species after exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 81: 1213-1222
- Tan S, Zhou F, Nielsen VG, Wang Z, Gladson CL, Parks DA (1999) Increased injury following intermittent fetal hypoxia-reoxygenation is associated with increased free radical production in fetal rabbit brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 972-981
- Tauler P, Aguilo A, Cases N, Sureda A, Gimenez F, Villa G, Cordova A, Biescas AP (2002) Acute phase immune response to exercise coexists with decreased neutrophil antioxidant enzyme defences. *Free Rad Res* 36: 1101-1107
- Tauler P, Sureda A, Cases N, Aguilo A, Rodriguez-Marroyo JA, Villa G, Tur JA, Pons A (2006) Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *J Nutr Biochem* 17: 665-671
- Terada LS (1996) Hypoxia-reoxygenation increases O₂⁻ efflux which injures endothelial cells by an extracellular mechanism. *Am J Physiol* 270: H945-950
- Thackham JA, McElwain DL, Long RJ (2008) The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review. *Wound Repair Regen* 16: 321-330
- Thom SR (2009) Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol* 106: 988-995
- Tirosh O, Reznick AZ (2000) Chemical bases and biological relevance of protein oxidation. In Sen CK, Parker L, Hänninen O (eds) *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise* Elsevier Amsterdam: pp 89-114
- Umbrello M, Dyson A, Feelisch M, Singer M (2013) The Key Role of Nitric Oxide in Hypoxia: Hypoxic Vasodilation and Energy Supply-Demand Matching. *Antioxid Redox Signal*
- Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM (1994) Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2607-2610

- Vile GF, Tyrrell RM (1993) Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J Biol Chem* 268: 14678-14681
- Vina J, Servera E, Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Ferrero JA, Garcia-De-La-Asuncion J, Anton V, Marin J (1996) Exercise causes blood glutathione oxidation in chronic obstructive pulmonary disease: prevention by O₂ therapy. *J Appl Physiol* 81: 2198-2202
- Yao Z, Tong J, Tan X, Li C, Shao Z, Kim WC, vanden Hoek TL, Becker LB, Head CA, Schumacker PT (1999) Role of reactive oxygen species in acetylcholine-induced preconditioning in cardiomyocytes. *Am J Physiol* 277: H2504-2509
- Yogarathnam JZ, Laden G, Madden LA, Seymour AM, Guvendik L, Cowen M, Greenman J, Cale A, Griffin S (2006) Hyperbaric oxygen: a new drug in myocardial revascularization and protection? *Cardiovasc Revasc Med* 7: 146-154
- Young AJ, Lowe GM (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys* 385: 20-27
- Yu BP (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162



UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut
Grup de Recerca en Nutrició Comunitària i Estrès Oxidatiu
Laboratori de Ciències de l'Activitat Física



Grupo CB12/03/30038